



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Analytické parametry stanovení anti-HCV a HCV antigenu

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA**

Autor: Zuzana Schovancová

Vedoucí práce: Mgr. Kateřina Černá Pilátová, Ph.D.

České Budějovice 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Analytické parametry stanovení anti-HCV a HCV antigenu*“ jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 29. 04. 24

.....

podpis

Poděkování

Ráda bych chtěla vyjádřit své upřímné poděkování Mgr. Kateřině Černé Pilátové, Ph.D., za její mimořádné vedení a neocenitelné rady, které mi byly poskytnuty během přípravy této bakalářské práce. Její ochota sdílet odborné znalosti, věnovat čas a trpělivost mému výzkumu byla pro mě nejen inspirací, ale také zásadní pro úspěšné dokončení mé práce. Také děkuji všem pracovníkům ÚLM OKMI FN Brno za jejich odbornou pomoc a příjemné pracovní prostředí. V neposlední řadě děkuji své rodině za velkou podporu, kterou mi poskytovali během studia.

Analytické parametry stanovení anti-HCV a HCV antigenu

Abstrakt

Hepatitida C je globální zdravotní problém, který postihuje miliony lidí a je hlavní příčinou jaterních onemocnění, včetně cirhózy a hepatocelulárního karcinomu. Vzhledem k asymptomatickému průběhu mnoha infekcí je potřebná efektivní laboratorní diagnostika. Cílem této bakalářské práce bylo provést komparativní analýzu dvou diagnostických metod pro detekci anti-HCV a HCV antigenu ve vzorcích séra a plazmy pacientů a posoudit jejich diagnostickou správnost na základě srovnání s kvantitativní PCR a specifickým imunoblotem. V rámci studie byly použity metody chemiluminiscenční mikročasticová imunoanalýza (CMIA) na přístroji Architect i2000SR a elektrochemiluminiscenční imunoanalýza (ECLIA) na přístroji Cobas Pure.

Vědecký přínos práce spočívá ve zhodnocení a popisu diagnostické efektivity a omezení obou testovacích metod v laboratorní praxi, což může přispět k preciznější diagnostice hepatitidy C a možnému zlepšení diagnostických postupů, což má důležité implikace pro klinickou praxi, zejména ve vztahu k výběru vhodné diagnostické metody v závislosti na klinickém kontextu pacienta.

Klíčová slova

Hepatitida C; anti-HCV; HCV Ag; chemiluminiscenční mikročasticová imunoanalýza; elektrochemiluminiscenční imunoanalýza; HCV RNA

Analytical parameters for the determination of anti-HCV and HCV antigen

Abstract

Hepatitis C is a global health problem that affects millions of people and is a major cause of liver disease, including cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Due to the asymptomatic course of many infections, effective laboratory diagnosis is needed. The aim of this bachelor thesis was to perform a comparative analysis of two diagnostic methods for the detection of anti-HCV and HCV antigen in serum and plasma samples from patients and to assess their diagnostic accuracy by comparison with quantitative PCR and specific immunoblotting. The methods used in the study were chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) on the Architect i2000SR and electrochemiluminescent immunoassay (ECLIA) on the Cobas Pure.

The scientific contribution of this thesis lies in the evaluation and description of the diagnostic performance and limitations of both test methods in laboratory practice, which may contribute to a more accurate diagnosis of hepatitis C and possible improvement of diagnostic procedures, which has important implications for clinical practice, especially in relation to the selection of the appropriate diagnostic method depending on the clinical context of the patient.

Key words

Hepatitis C; anti-HCV; HCV Ag; chemiluminescent microparticle immunoassay; electrochemiluminescent immunoassay; HCV RNA

Obsah

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Úvod | 8 |
| 2 | Teoretická část | 9 |
| 2.1 | Charakteristika virové hepatitidy typu C..... | 9 |
| 2.1.1 | Akutní virová hepatitida C..... | 10 |
| 2.1.2 | Chronická virová hepatitida C..... | 10 |
| 2.2 | Virus HCV..... | 11 |
| 2.2.1 | Reprodukce viru v organismu..... | 12 |
| 2.2.2 | Genotypy HCV..... | 15 |
| 2.3 | Léčba HCV..... | 15 |
| 2.4 | Laboratorní Diagnostika HCV..... | 16 |
| 2.4.1 | Screening HCV..... | 18 |
| 2.4.2 | Serologické metody..... | 20 |
| 2.4.2.1 | Stanovení pomocí CMIA..... | 20 |
| 2.4.2.2 | Stanovení pomocí ECLIA..... | 21 |
| 2.4.2.3 | Konfirmační test pro stanovení protilátek IgG proti viru hepatitidy C pomocí metody Western blot..... | 21 |
| 2.4.3 | Molekulárně–diagnostické vyšetření HCV RNA pomocí PCR..... | 23 |
| 2.4.4 | Diagnostická správnost metody..... | 24 |
| 3 | Cíle práce a hypotézy | 26 |
| 4 | Metodika | 27 |
| 4.1 | Preanalytická fáze..... | 27 |
| 4.2 | Analýza..... | 28 |
| 4.2.1 | Architect i2000 _{SR} Anti-HCV..... | 28 |
| 4.2.1.1 | Reagenice, princip a postup vyšetření:..... | 29 |
| 4.2.1.2 | Interpretace výsledků..... | 32 |
| 4.2.2 | Architect i2000 _{SR} HCV Ag..... | 33 |
| 4.2.2.1 | Reagenice, princip a postup vyšetření:..... | 33 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.2.2.2 | Interpretace výsledků | 34 |
| 4.2.3 | Elecsys HCV Duo | 34 |
| 4.2.3.1 | Princip a postup vyšetření | 35 |
| 4.2.3.2 | Interpretace výsledků | 39 |
| 4.3 | Sběr pacientů | 39 |
| 5 | Výsledky | 41 |
| 5.1 | Vyšetření vzorků na protilátky proti hepatitidě C | 41 |
| 5.2 | Vyšetření vzorků na HCV antigen | 45 |
| 5.3 | Korelace HCV Ag a PCR | 48 |
| 5.4 | Kazuistika | 49 |
| 6 | Diskuze | 52 |
| 7 | Závěr | 55 |
| 8 | Seznam použitých zdrojů | 56 |
| 9 | seznam obrázků | 60 |
| 9.1 | Seznam grafů | 60 |
| 9.2 | Seznam tabulek | 60 |
| 10 | Seznam zkratk | 61 |

1 Úvod

Virové hepatitidy představují významný globální zdravotní problém. I přesto, že pro tato onemocnění existuje několik úrovní velmi účinné prevence, ročně si vyžádá odhadem 1–2 miliony úmrtí na celém světě. Můžeme je dělit dle délky trvání na akutní a chronické formy. Akutní stadia jsou znepokojující svou prevalencí, zatímco chronické fáze, které se rozvíjejí po šesti měsících od expozice, mohou vést k jaterní cirhóze nebo hepatocelulárnímu karcinomu. (KHSSTC, 2022)

Virové hepatitidy označované písmeny A, B, C, D, E, G, mají zásadní dopad na veřejné zdraví, zvláště hepatitida C, jako nejčastější příčina jaterních onemocnění ve vyspělých zemích. Tato infekce je významným zdravotním problémem kvůli své vysoké prevalenci, asymptomatickému průběhu a potenciálnímu přechodu do chronického stadia, což představuje riziko pro jednotlivce i společnost. Absence účinné vakcíny a riziko šíření viru dále podtrhují potřebu pokročilé laboratorní diagnostiky a screeningových programů. Tyto iniciativy jsou nezbytné pro včasnou identifikaci infikovaných jedinců, zahájení léčby a minimalizaci dalšího šíření infekce. (KHSSTC, 2022)

2 Teoretická část

2.1 Charakteristika virové hepatitidy typu C

V roce 1989 byl virus hepatitidy C poprvé izolován. Do této doby byla tato nemoc považována za záhadnou, jelikož se nedala plně klasifikovat jako hepatitida A nebo B, což vedlo k označování jako "non-A, non-B hepatitis" (hepatitida, která není typu A ani B). Tato terminologie odrážela nejen neznalost původce, ale také obtíže při diagnostikování a léčení této nové formy hepatitidy. (Husa, 2005)

Podle Světové zdravotnické organizace je globální odhad počtu lidí s chronickou infekcí hepatitidy C přibližně 50 milionů. Každý rok přibývá asi 1,0 milion nových infekcí. V roce 2022 zemřelo na komplikace spojené s virovou hepatitidou C (VHC), a to převážně na cirhózu a hepatocelulární karcinom přibližně 242 000 lidí. (WHO, 2024)

Vzhledem k omezené dostupnosti údajů pro určité země je tento odhad odvozen spíše z vážených průměrů pro regiony než pro konkrétní země. Spojené království a Skandinávie hlásily nejnižší míru prevalence (0,01 %–0,1 %), zatímco Egypt hlásil nejvyšší míru prevalence (15 %–20 %). (Alter, 2007)

Infekce virem hepatitidy C patří mezi krví přenosné infekce.

Primárními cestami, jimiž se virus hepatitidy C (HCV) přenáší, jsou:

- Transfuze krevních produktů
- Užívání drog injekční cestou
- Provádění tetování a piercingu v neaseptických podmínkách, často v amatérském prostředí
- Pravidelné léčebné procedury dialýzou
- Riziko profesní expozice viru
- Sexuální styk s HCV pozitivní osobou
- Domácí kontakt s HCV pozitivní osobou
- Vertikální přenos z matky pozitivní na HCV na novorozence během perinatálního období

- Iatrogenní přenos, tedy přenos skrze lékařské zákroky
- Přenos skrze transplantaci orgánů před rokem 1992

Od zavedení pravidelného testování dárců krve na přítomnost HCV v roce 1992 se hlavním zdrojem šíření viru stalo sdílení kontaminovaných nástrojů při injekčním užívání drog. (Urbánek, 2017)

Onemocnění virové hepatitidy C se dále rozděluje dle délky trvání na akutní a chronickou HCV. (Urbánek, 2017)

2.1.1 Akutní virová hepatitida C

Akutní HCV je rané stádium, kdy se známky infekce během šesti měsíců nedaří eliminovat. Inkubační doba je velmi dlouhá, až 180 dní. Dále iniciální fáze je u většiny pacientů asymptomatická a v jedné třetině se objevují nespecifické příznaky, jako je nechutenství, nevolnost, bolest svalů a kloubů. Ikterus tedy žloutnutí tkání, kůže a očního bělma se vyvine zcela výjimečně. Z tohoto důvodu je akutní stádium diagnostikováno zřídka a infekce přechází do chronicity. (Urbánek et al., 2019; NextLab, 2024)

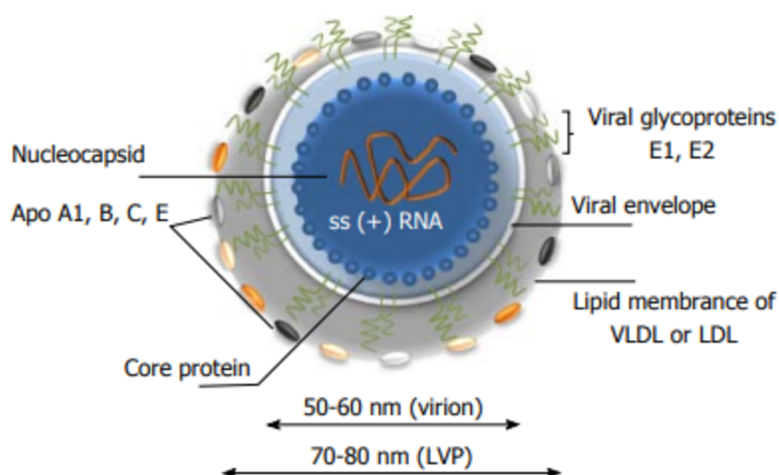
Existují však pacienti, je jich okolo 15–30 %, kteří se spontánně vyléčí díky vlastní silné obranyschopnosti. Záleží však na věku, infekční dávce nebo na přidružených nemocích. (Urbánek et al., 2019; NextLab, 2024)

2.1.2 Chronická virová hepatitida C

Chronickou fází můžeme definovat jako přítomnost infekce delší než šest měsíců. Průběh zůstává též bez symptomů nebo jsou velmi mírné, například pacienta trápí občasná únava, nevýrazné bolesti břicha hlavně v oblasti pod žebry na pravé straně či nevolnost. Úskalí tohoto problému spočívá v postupném poškození jater až po jejich cirhózu, aniž by pacient pociťoval jakýkoliv diskomfort. S cirhózou jater přichází i další závažná komplikace, a tou je HCC (hepatocelulární karcinom). Celkově je průběh chronické HCV komplexní a variabilní u každého pacienta, některým jedincům postupuje pomalu a latentní fáze trvá i několik let, ovšem jiní mohou mít nástup o mnoho rychlejší, a proto je důležitá včasná diagnóza. (Urbánek et al., 2019; Zaltron, 2012)

2.2 *Virus HCV*

HCV je relativně malý, obalený virus, který má pozitivní jednovláknovou RNA, složenou asi z 9600 nuklotidů. Patří do čeledi *Flaviviridae* a rodu *Hepacivirus*. Studie ukázaly, že obalené částice jsou přibližně ikosaedrické (20 stěn), tedy zdánlivě kulovitého tvaru a mají průměr v rozmezí od 56 do 65 nm, kdežto virové jádro měří přibližně 45 nm. Virionová membrána viru obsahuje hroty o velikosti zhruba 6 nm a jsou složeny z heterodimerů glykoproteinů E1 a E2 (obr. 1). (Morozov a Lagaye, 2018)



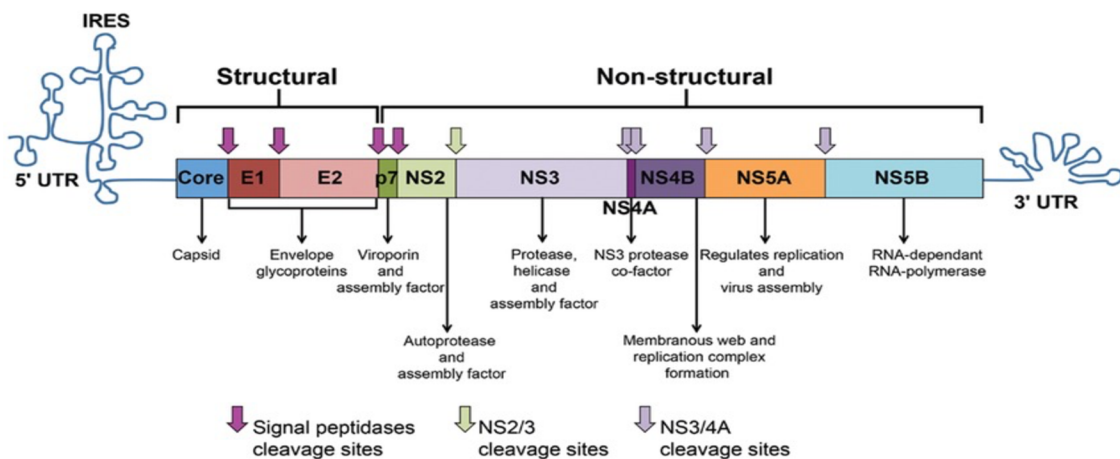
Obrázek 1 *Virus hepatitidy C* (Zdroj: Morozov & Lagaye, 2018)

Genom HCV

Virový genom (obr. 2) se skládá z 5' a 3' koncových nekódujících oblastí (UTR), které obsahují sekundární struktury RNA nezbytné pro virovou replikaci a z centrálního kódujícího regionu. 5' UTR je vysoce konservativní oblast o délce 341–344 nukleotidů sloužící mimo jiné k navázání HCV RNA na ribozomální aparát hostitele. Jedná se tedy o vnitřní vstupní místo do ribozomu (IRES), kde se zahajuje translace proteinů. Kódující oblast HCV genomu lze dále rozdělit na část obsahující genetickou informaci pro strukturální proteiny (oblasti C, E1 a E2) a oblasti nesoucí informaci pro nestrukturální proteiny NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A a NS5B. Jádro (core protein) je stavební jednotkou virového nukleokapsidu. Obalové glykoproteiny E1 a E2 interagují s virovými receptory na permissivních buňkách a zprostředkovávají vstup viru. E2 obsahuje také hypervariabilní oblasti (HVR = hypervariable region) – jedná se o dva úseky HVR 1 a HVR 2 nesoucí genetickou informaci virového obalu. Vysoká proměnlivost tohoto antigenního lokusu je součástí virové strategie a ochrany, neboť jsou cílem

neutralizačních protilátek hostitele. P7 působí jako aviroporin, tedy tvoří iontový kanál. NS2 má autoproteázovou aktivitu nezbytnou pro štěpení polyproteinu mezi NS2 a NS3. NS3 působí jako serinová proteáza v kombinaci s NS4A, která působí jako kofaktor katalyzující zpracování polyproteinu HCV. NS3 také vykazuje RNA helikázovou a NTPázovou aktivitu, což je esenciální pro proces replikace viru. Tato dvojitá aktivita NS3 je podstatná pro efektivní replikaci viru HCV a představuje potenciální cíl pro antivirotickou intervenci.

(Abdel-Hakeem & Shoukry, 2014; Boulestin et al., 2002; Wahaab et al., 2022)



Obrázek 2 Genom HCV (Zdroj: Abdel-Hakeem & Shoukry, 2014)

2.2.1 Reprodukce viru v organismu

Virus hepatitidy C (HCV) je známý svou schopností replikovat se v jaterních buňkách (hepatocytech). Reprodukční cyklus tohoto viru je složitý proces, řízený sérií interakcí s hostitelskými faktory a lipoproteiny. Tato schopnost HCV, vyhnout se imunitní odpovědi a úspěšně vstoupit do hepatocytů, je klíčová pro jeho přežití a šíření se v organismu.

Na začátku infekce hrají roli apolipoproteiny, které tvoří lipovirové částice (LPV). Tyto částice se asociováním s hostitelskými lipoproteiny VLDL a apolipoproteiny (apoE a apoCI) stávají součástí krevního oběhu. Tato asociace s lipidy poskytuje HCV ochranu před imunitní odpovědí a zároveň umožňuje viru interagovat s hostitelskými faktory, což napomáhá vstupu do hepatocytů.

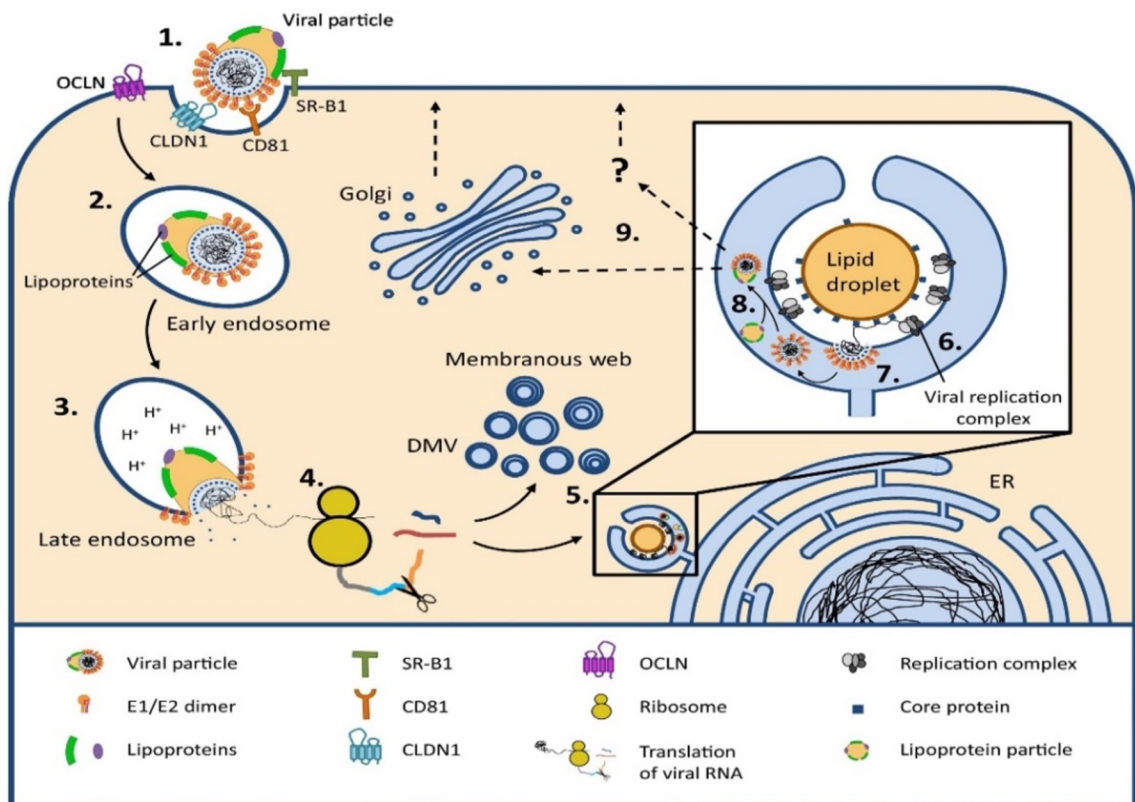
Reprodukční cyklus HCV lze rozdělit do několika kroků, což začíná vazbou viru na buněčný povrch. HCV interaguje s jaterními sinusovými endotelovými buňkami, Kupfferovými buňkami a s buňkami exprimujícími molekuly L-SIGN (sinusoidální endoteliální buňky v játrech a lymfatických uzlinách) a DC-SIGN (dendritické buňky). Vazba HCV na hepatocyty je zprostředkována vazbou na hostitelské faktory, jako jsou receptory lipoproteinů o nízké hustotě (LDLR), tetraspanin CD81, scavenger receptor třídy B typu 1 (SR-BI), klaudin (CLDN1), okludin (OCLN) a další. Tyto faktory společně s virovými glykoproteiny E1 a E2 umožňují viru přecházet z krve na povrch hepatocytu a následně interagovat s dalšími receptory na membráně buňky.

Receptorově zprostředkovaná endocytóza je důležitým mechanismem vstupu HCV do buňky. Interakce glykoproteinů E1 a E2 s LDLR, CD81, SR-BI, klaudinem CLDN1 a dalšími faktory umožňuje internalizaci viru do buňky klathrin–dependetní endocytózou. Tato internalizace je kritickým okamžikem v procesu infekce, který umožňuje přenos viru do endosomů.

Fúze v endosomálním kompartmentu je poslední fází vstupu HCV do hepatocytu. Tento proces je pH-dependentní a vyvolává konformační změny v obalových glykoproteinech. Dochází k fúzi viru a uvolnění virové RNA do cytoplazmy hepatocytu. Zde je spuštěn proces replikace a translace viru, který zajišťuje jeho úspěšné množení v hostitelské buňce.

Celkově lze konstatovat, že reprodukční cyklus HCV je pečlivě řízen sérií interakcí s hostitelskými faktory a lipoproteiny (obr. 3). Tato schopnost viru efektivně vstoupit do hepatocytu a následně se množit má klíčový význam pro jeho přežití v hostitelském organismu.

(Bunz et al., 2022; Seng-Lai, 2006)



Obrázek 3 Vstup a replikace viru v hepatocytu (Zdroj: Bunz et al., 2022)

V detailnějším popisu obrázku 3 vidíme, jak virová částice vstupuje do buňky po navázání částice obsahující lipoproteiny na receptor pro LDL, po kterém následuje specifická interakce virového glykoproteinu E2 s receptory SR-B1 a CD81. Následně se CD81 váže na proteiny těsného spojení CLDN1 a OCLN, což vede k endocytóze navázané virové částice (1). Po vstupu do buňky endocytózou a transportu do časných endozomů (2) dojde při acidifikaci v pozdních endozomech k uvolnění virové RNA do cytoplazmy (3). RNA je poté přeložena a polyprotein zpracován (4), což následuje tvorbou membránové sítě pro replikaci RNA (5). Replikace RNA probíhá na povrchu lipidových kapének (6) a vznikající virové částice se sestavují v ER (endoplazmatické retikulum) s pomocí heterodimeru E1-E2 (7). Viriony jsou pak ve spojení s lipoproteiny dozrávají v ER (8). Přesný mechanismus uvolňování HCV z buňky zůstává nejasný, proto se znázornil tento krok otazníkem. (9). (Bunz et al., 2022)

2.2.2 Genotypy HCV

Virus hepatitidy C (HCV) vykazuje šest odlišných genotypů, číslovaných od jedné do šesti, spolu s několika podtypy označenými písmeny, jako jsou například genotypy 1a a 1b. Některá literatura udává i 7. genotyp (7a) u pár jedinců ve střední Africe. Tyto genotypy se objevily jako geneticky odlišné skupiny během evolučního procesu viru.

Mezi celosvětově nejčastější patří genotyp 1 (včetně podtypů 1a nebo 1b) a hned za ním genotyp 3a s vysokou prevalencí v severní Evropě a jižní Asii. Menšina pacientů je infikována genotypy 2, 4, 5 nebo 6. Je pozoruhodné, že genotyp 4 převládá v Africe ve srovnání s jinými regiony, genotyp 6 se vyskytuje hlavně v Asii a genotyp 5 se primárně vyskytuje v Jižní Africe. Obecně se pozoruje, že pacienti s HCV typicky vykazují spíše jeden převládající genotyp. Je také důležité poznamenat, že genotyp hepatitidy C jedince zůstává v průběhu času konzistentní, proto postačí pouze jediné testování.

Pochopení genotypu HCV pacienta má cenný význam, protože pomáhá lékařům při identifikaci nejúčinnějšího léčebného postupu, různé genotypy totiž vykazují různé reakce na léky používané k léčbě a eradikaci HCV.

(Urbánek, 2019; U.S. Department of Veterans Affairs (VA), 2018)

V České republice se vyskytuje nejvíce genotyp 1a, b a 3.

2.3 Léčba HCV

Od počátku 21. století zahrnoval běžný přístup k léčbě chronické infekce virem hepatitidy C (HCV) použití kombinace pegylovaného interferonu alfa (PEG-INF) a ribavirinu. PEG-INF pomáhá posílit imunitní systém pacienta v boji s virem, zatímco ribavirin působí tak, že snižuje hladiny viru v těle a zvyšuje účinnost interferonu. V posledních letech nastala v oblasti farmakologie zásadní revoluce. Nové algoritmy léčby umožňují aplikaci terapie s minimem nežádoucích účinků a jednoduchým dávkováním, obvykle v průběhu dvanácti týdnů, avšak v některých případech i po dobu osmi týdnů. Jedná se tzv. IFN-free (bezinterferonovou) léčbu, kdy se kombinují

minimálně dvě přímo působící virostatika (DAA, Direct-acting antivirals), jež se využívá v boji proti chronické hepatitidě C. (Hejda, 2016; Husa, 2019)

DAA jsou rozdělena na základě jejich účinku v rámci virového cyklu (interferující, inhibující konkrétní fázi cyklu). V současné době jsou k dispozici různé typy těchto přípravků:

- Inhibitory NS3/4A proteázy (s příponou -previr): simeprevir (SMV), telaprevir (TPV), boceprevir (BOC), paritaprevir, asunaprevir, grazoprevir,
- Inhibitory NS5B polymerázy (s příponou -buvir): sofosbuvir (SOF), dasabuvir, beclabuvir,
- Interference s NS5A replikačním komplexem (s příponou -asvir): daclatasvir (DCV), ledipasvir (LDV), veltapasvir (VEL), ombitasvir, elbasvir. (Hejda, 2016)

Léčba by měla být posouzena na základě analýzy různých faktorů, jako jsou např. stav pacienta a jeho vnímavost, koinfekce (HIV, HBV) či stádium jaterního onemocnění. Důležitá je i pečlivá sledovanost virové aktivity během počátečních fází antivirové léčby. Délku léčby lze přesně přizpůsobit tak, aby vyhovovala každému jednotlivému pacientovi. Vnímovost pacienta je vyšetřována pomocí testu na protilátky proti viru HCV a virová aktivita je sledována měřením virové RNA metodu PCR (polymerázová řetězová reakce). (Hejda, 2016; Husa, 2019)

Cílem terapie je zabránit rozvoji komplikací HCV infekce, což je podmíněno dosažením eradikace infekce HCV. Za důkaz eradikace infekce se bere dosažení SVR (sustained virologic response, setrvalá virologická odpověď) tedy stavu, kdy se v krvi pacienta nedají pomocí PCR detekovat žádné stopy viru hepatitidy C po ukončení léčby. (Husa, 2019)

2.4 Laboratorní Diagnostika HCV

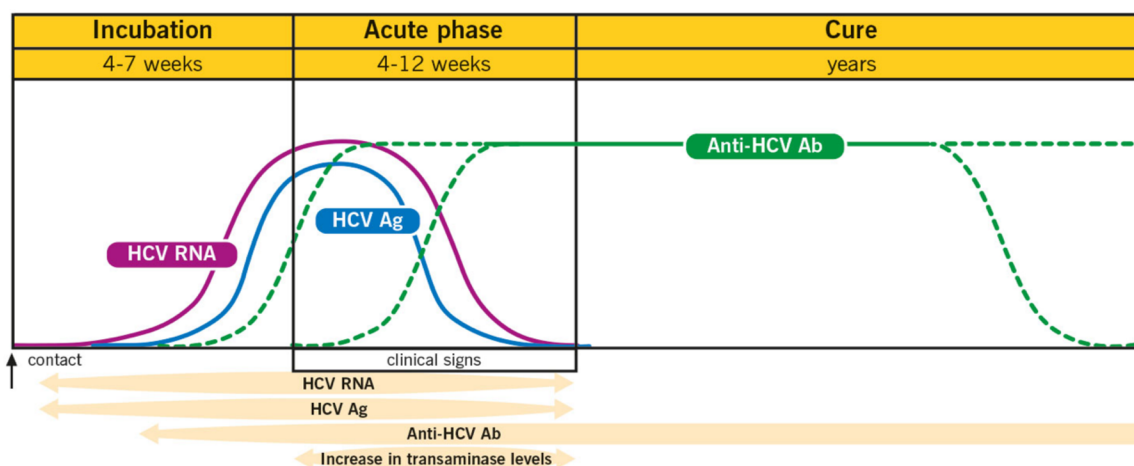
Diagnostické postupy pro detekci infekce HCV lze rozdělit na dvě kategorie. První z nich jsou přímé metody, které umožňují identifikaci specifických antigenů (HCV Ag) nebo virové RNA v pacientově krvi, a další z nich jsou nepřímé serologické metody, jež zjišťují

přítomnost anti-HCV protilátek, případně lze sledovat také aktivitu ALT v séru/plazmě pacienta.

Metody zaměřené na detekci protilátek anti-HCV jsou specificky orientovány na identifikaci imunoglobulinů třídy G (IgG). Tato třída protilátek, která je detekovatelná v krevním oběhu pacienta potenciálně po celý život, indikuje expozici viru hepatitidy C. Přestože tyto IgG protilátky poskytují důkaz o předchozí expozici nebo stávající infekci, není jim přisuzována schopnost neutralizovat virus, a tudíž nezajišťují ochranu proti možné reinfekci. (“Trendy v Hepatologii”, 2010)

Zajímavou alternativou k PCR je metoda detekce antigenů HCV, která má nižší riziko kontaminace. Je určena ke kvantitativnímu stanovení core antigenu viru hepatitidy C v lidském séru a plazmě, které lze provádět na imunoanalytických systémech. HCV Ag je přímý marker infekce a má vynikající korelaci s koncentracemi HCV RNA, ačkoliv má stále nižší citlivost. Při screeningovém vyšetření HCV přesto výrazně redukuje tzv. diagnostické okno (obr.4) a je možné s ním monitorovat léčbu, ale nelze s ním potvrdit SVR. (Majchrzak et al., 2022)

Důležitým parametrem je i sérová aktivita alaninaminotransferázy (ALT) v kontextu chronické virové hepatitidy C, kdy je typicky mírně zvýšená, obvykle jeden až dvojnásobek horní hranice normálního rozmezí (někteří pacienti mohou mít dokonce aktivitu ALT v normě). V důsledku toho je nutné, aby pacienti s mírným zvýšením aktivity ALT podstoupili alespoň jednou test prokazující infekci HCV. (Hejda, 2016)



Obrázek 4 Kinetika markerů od expozice viru (Zdroj: Hepatitis C antibodies: Hepatitis C, c2024)

2.4.1 *Screening HCV*

V současné době je pro MZČR kontrola HCV infekce prioritou. Proto k základním postupům screeningu infekce patří identifikace rizikových skupin, kde je pravděpodobnost kumulace infikovaných osob.

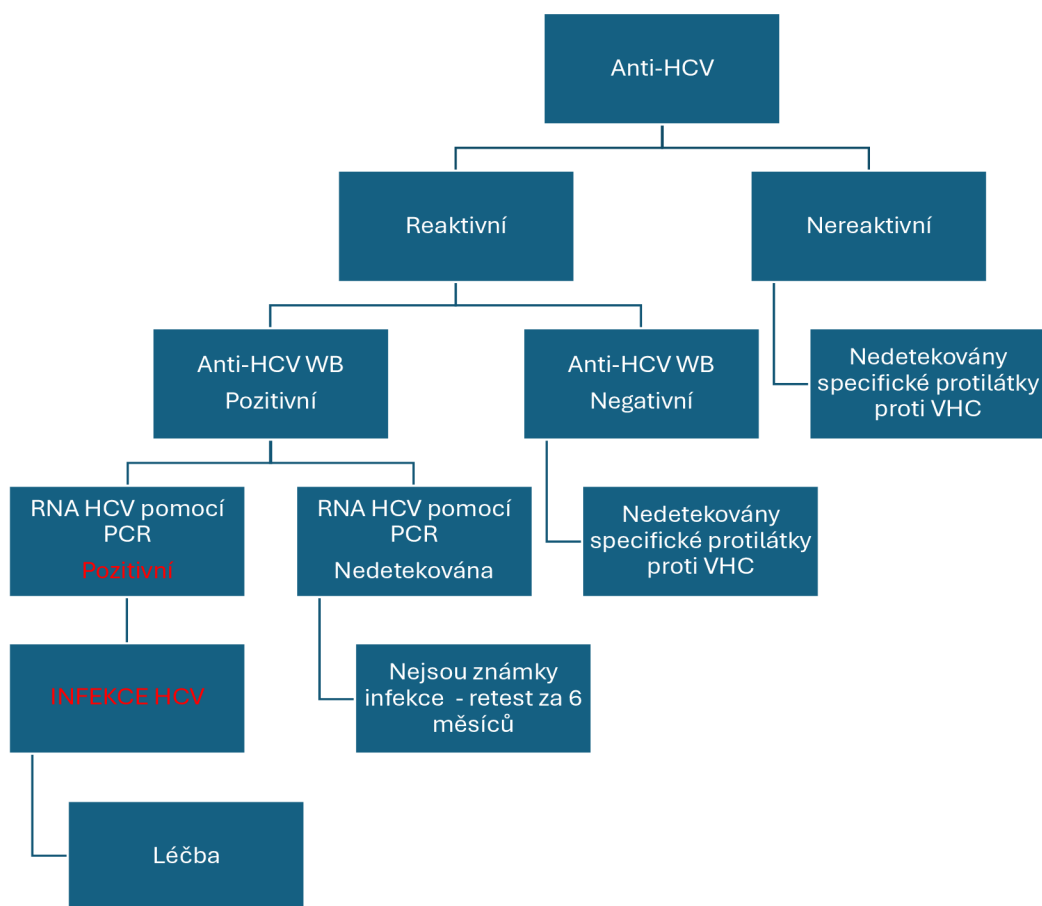
Screeningový test na infekci virem HCV je vyšetření protilátek proti viru hepatitidy C, tedy anti-HCV. Všichni lidé, u kterých existuje podezření, že jsou nebo v průběhu života byli exponováni některému z rizikových faktorů přenosu, by měli být testováni na reaktivitu anti-HCV. Na základě vědomostí o možnostech přenosu se doporučuje testování zejména u následujících skupin osob:

- s předchozí anamnézou injekčního užívání drog, včetně jednorázových aplikací (PWID)
- vězni
- příjemci krevních derivátů či příjemci orgánových transplantátů před rokem 1992
- HIV pozitivní osoby
- MSM (men who have sex with men) – muži mající sex s muži
- hemofilici léčení před rokem 1987
- osoby s anamnézou hemodialýzy (i akutní a krátkodobé)
- osoby u kterých dochází k nevysvětlitelnému zvýšení hladiny aminotransferáz (ALT).
- nově od 1.1.2024 se doporučuje testovat všechny těhotné ženy bez předchozí indikace či podezření
- děti narozené HCV pozitivním matkám, které jsou testovány až po 18. měsíci věku
- zdravotničtí pracovníci a jiné osoby s iatrogenním rizikem přenosu

(KDP UZIS, 2021; Urbánek et al., 2017)

Mezi skupiny, u kterých je povinné provádět screeningové vyšetření na přítomnost viru hepatitidy C (HCV), jak je definováno ve *Vyhlášce o lidské krvi* (2008), patří dárce krve.

Nepřítomnost protilátek nevylučuje HCV infekci v ranné akutní fázi, v tomto případě může být tzv. imunologické okno, které je velmi variabilní a pohybuje se v rozmezí 3–8 týdnů. Přítomnost viru ukazující na aktivní (buď akutní nebo chronickou) infekci musí být ještě potvrzena testováním HCV Ag nebo RNA (obr.5).



Obrázek 5 schéma screeningu HCV (Zdroj: vlastní)

Schéma nám jasně znázorňuje doporučení postupu diagnostiky screeningu. (KDP UZIS, 2021). Pojmy „reaktivita“ a „nereaktivita“ označují, zda vzorek séra nebo plazmy projevil reakci v rámci testované metody, aniž by tím byla daná reakce definitivně potvrzena (tzv. konfirmována). Výsledky serologických testů (např. HCV, HIV, CMV, EBV) mohou být zatíženy nespecifickou/zkříženou reaktivitou, proto se obvykle reportují jako reaktivní nebo nereaktivní. Po provedení konfirmační testovací metody, která poskytuje

definitivní potvrzení, jsou výsledky následně reportovány jako pozitivní nebo negativní. Tento postup zajistí, že předběžně identifikované reaktivity mohou být důkladně ověřeny, přičemž se minimalizuje riziko falešně pozitivních nebo falešně negativních výsledků.

2.4.2 Serologické metody

Stanovení přítomnosti anti-HCV i HCV antigenu se provádí metodami různých variant založených na enzymatické imunoanalýze (např. CMIA, ECLIA, CLIA). Tyto metody mají až 97 % senzitivitu a až 99 % specificitu. Přesto, že jsou tyto metody vysoce senzitivní a specifické, musí být například pozitivita anti-HCV confirmována imunoblotem, aby se vyloučila zkřížená reaktivita. (“Trendy v Hepatologii”, 2010)

2.4.2.1 Stanovení pomocí CMIA

Jedna z častých používaných metod v serologii je Chemiluminiscenční imunoanalýza na paramagnetických mikročásticích (CMIA). Metoda je založena na paramagnetických mikročásticích, které jsou potaženy krystaly oxidu železa, vykazující magnetické vlastnosti. Na tyto mikročástice jsou na jejich povrch navázány také specifické antigeny (např. HCV Ag) nebo monoklonální (myší) protilátky proti stanoveným analytům (např. anti-HCV). Imunochemická reakce váže analyty (např. anti-HCV nebo HCV Ag) na mikročástice. Při následném promývání jsou mikročástice působením magnetu zachyceny na stěně reakční cely. Po odstranění nezreagovaných složek se specificky naváže druhá polyklonální nebo monoklonální protilátka s chemiluminiscenční značkou a vznikne imunokomplex. Jako chemiluminiscenční značení se používá ester akridinu. K takto vzniklým imunokomplexům se přidává peroxid vodíku, který zabraňuje předčasné emisi záření a odštěpuje akridinové barvivo z konjugátu v imunokomplexu. Chemiluminiscenční reakce se spouští přidáním hydroxidu sodného. Akridin se pak oxiduje peroxidem vodíku a hydroxidem sodným. Tento proces vede k chemiluminiscenční reakci s uvolněním energie ve formě emise světla. (Abbott Diagnostic, 2019)

2.4.2.2 Stanovení pomocí ECLIA

Dále se velmi často využívá metoda Elektrochemiluminiscence (ECLIA). Jedná se o variantu chemiluminiscence, při které se luminiscenční záření generuje chemickými reakcemi iniciovanými elektrochemicky. Elektrochemiluminofory se stávají především z komplexů ruthenia (Ru), rhodia (Rh) nebo osmia (Os). Oxidace těchto elektrochemiluminoforů se provádí elektrochemicky na povrchu zlatých (Au) nebo platinových (Pt) anod. Nejvýznamnějším v současnosti používaným komplexem je tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, který má vysoké kvantové výtěžky a může být snadno navázán na proteiny, nukleové kyseliny, protilátky a antigeny. Má také vynikající rozpustnost a stabilitu ve vodě a dalších roztocích. Kromě toho se také používají deriváty komplexů ruthenia a dalších kovů.

(“Assays employing electrochemiluminescent labels and electrochemiluminescence quenchers”; Forster et al., 2009)

Imunoanalytická reakce probíhá na pevné fázi obsahující magnetické částice, které jsou potaženy streptavidinem. Streptavidin, což je protein izolovaný z bakterie *Streptomyces avidinii*, je známý svou vysokou afinitou k biotinu, a běžně se tak používá v laboratorní medicíně. Na streptavidin je vázán biotinylovaný antigen nebo protilátka, kterou chceme stanovit. (Roche Diagnostic, 2023)

2.4.2.3 Konfirmační test pro stanovení protilátek IgG proti viru hepatitidy C pomocí metody Western blot

Vyšetření specifických IgG protilátek namířených proti izolovaným rekombinantním antigenům viru hepatitidy C v séru nebo plazmě se provádí tehdy, kdy předchází vyšetření na zjištění přítomnosti celkových anti-HCV IgG protilátek bylo reaktivní. Vysoká specifita je zajištěna interakcí s izolovanými rekombinantními antigeny. Western blot umožňuje identifikovat infekci jak v její akutní, tak v pozdější fázi.

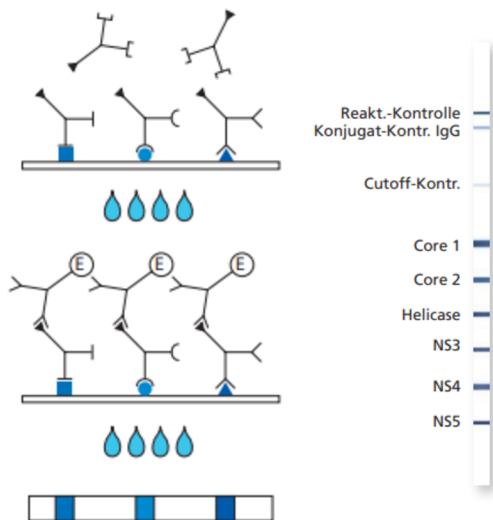
(Mikrogen Diagnostic, 2023)

Imunoblot, často označovaný jako Western blot, je metodika pro detekci specifických proteinů. V případě stanovení anti-HCV se jedná o antigeny core 1, core 2, helikáza, NS3,

NS4 a NS5. V diagnostické laboratoři se běžně provádí na komerčně dostupných stripech, které obsahují výše zmíněné specifické antigeny.

Postup probíhá následovně:

Testovací stripy jsou inkubovány s ředěným patientským vzorkem séra nebo plazmy. Pokud patientský vzorek obsahuje HCV protilátky proti výše zmíněným antigenním strukturám, naváží se na ně. Po inkubaci následuje vymytí nenavázaných částic. V dalším kroku jsou proužky inkubovány s konjugátem (protilátka proti lidskému IgG s navázanou peroxidázou). Nenavázané částice jsou po inkubaci vymyty. Následuje přidání substrátu a nastává barvicí reakce katalyzovaná peroxidázou. V místě positivity se objeví tmavý pruh. Na vyšetřovacím stripu můžeme vidět pozitivní reakci ve všech antigenech (obr.6). Dále testovací strip obsahuje několik typů kontrol – reakční, která slouží k ověření funkčnosti stripu, konjugátová zjišťuje, zda je přidán konjugát aktivní a schopen se vázat na cílové antigenní struktury a cutoff kontrola stanovuje prahovou hodnotu, která rozlišuje pozitivní a negativní výsledky. (Mikrogen Diagnostic, 2023)



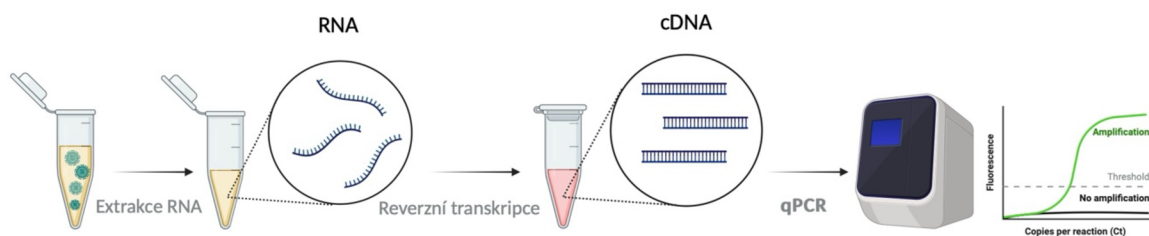
Obrázek 6 průběh reakce a výsledný testovací strip s pozitivní reakcí (Zdroj: Mikrogen Diagnostic, 2023)

2.4.3 Molekulárně–diagnostické vyšetření HCV RNA pomocí PCR

V rámci diagnostiky hepatitidy C hraje zásadní roli přímá detekce virové RNA (HCV RNA), obvykle prováděná ze séra nebo plazmy pacienta. Pro tento účel se široce využívá polymerázová řetězová reakce (PCR) v jejích kvalitativních i kvantitativních formách. Zejména kvantitativní analýza, realizovaná prostřednictvím tzv. kvantitativní reverzní transkripce PCR (qRT-PCR), představuje základní nástroj pro molekulárně diagnostická vyšetření, neboť umožňuje nejen detekci, ale i kvantifikaci virové RNA, což je nezbytné pro nastavení a optimalizaci léčebných postupů.

Metoda qRT-PCR (obr.7) zahajuje proces reverzní transkripce, při němž je virová RNA přepisována do komplementární DNA (cDNA) za použití enzymu reverzní transkriptázy. Po syntéze cDNA následuje fáze amplifikace a kvantifikace, podobná klasickému procesu real-time PCR, avšak s tím rozdílem, že výchozím materiálem je RNA, nikoli DNA. Tato specifika metody qRT-PCR poskytují významnou výhodu v podobě schopnosti kvantifikovat virovou nálož s nízkým detekčním limitem, typicky kolem 10–15 IU/ml, což je standard pro současné komerčně dostupné systémy. Tato citlivost činí qRT-PCR vhodnou metodu pro monitorování virové nálože (virémie) během léčby. Je důležité zdůraznit, že mezinárodní jednotka (IU), definovaná jako celkové množství RNA, nikoli počet kopií virového genomu v určitém objemu krve, je všeobecně uznávaná jednotka pro měření hladiny viru. (Pawlotsky et al., 2020)

Molekulárně genetické metody umožňují nejen kvantifikaci viru, ale také určení genotypu a subtypu HCV a identifikaci potenciálně léčivu rezistentních mutantních forem viru prostřednictvím genového sekvenování. Určení genotypu viru je nezbytné při prvotní diagnostice infekce hepatitidy C, což přispívá k efektivnímu výběru léčebné strategie. (Pawlotsky et al., 2020)



Obrázek 7 Obecné schéma qRT-PCR (Zdroj: Vlastní)

2.4.4 Diagnostická správnost metody

Termín diagnostická správnost se obecně používá k popisu celkové schopnosti diagnostického testu správně identifikovat přítomnost nebo nepřítomnost určitého zdravotního stavu. (Plzák, 2024)

Metriky Diagnostické správnosti:

1) Analytická Senzitivita a Specificita:

- Analytická senzitivita: zaměřuje se na schopnost testu detekovat nejnížší množství cílového analytu.
- Analytická specificita: vyjadřuje schopnost testu rozlišovat cílový analyt od jiných podobných látek přítomných ve vzorku.

2) Klinická Senzitivita a Specificita:

- Klinická senzitivita – skutečné pozitivní výsledky (SP): měří, jak dobře dokáže test identifikovat pacienty, kteří mají danou nemoc, což je kritické pro minimalizaci falešně negativních (FN) výsledků.

Číselné vyjádření výpočtem: $SP/(SP+FN)$

- Klinická specificita – skutečné negativní výsledky (SN): posuzuje, jak dobře test identifikuje pacienty bez nemoci, což je zásadní pro omezení falešně pozitivních (FP) výsledků.

Číselné vyjádření výpočtem: $SN/(SN+FP)$

3) Pozitivní a Negativní Prediktivní Hodnota (PPV a NPV):

- Pozitivní prediktivní hodnota (PPV): udává pravděpodobnost, že osoby s pozitivním testem skutečně mají nemoc.
- Negativní prediktivní hodnota (NPV): vyjadřuje pravděpodobnost, že osoby s negativním testem nemají nemoc.

(Plzák, 2024)

V klinických laboratořích mají, zejména klinická senzitivita a specifická spolu s PPV a NPV, přímý a zásadní vliv na diagnostické rozhodování a management pacientů v zdravotnických zařízeních. Jejich správné pochopení a využití zvyšuje kvalitu a efektivitu léčebných intervencí a přispívá k lepší celkové péči o pacienty.

3 Cíle práce a hypotézy

Cíl:

Cílem této práce je provést komparativní analýzu dvou imunoanalytických diagnostických metod pro detekci anti-HCV a HCV antigenu ve vzorcích séra/plazmy pacientů, s důrazem na hodnocení a porovnání jejich klinické senzitivity a specifity. Dále se práce zaměří na vyhodnocení korelace mezi výsledky kvantitativního imunoanalytického stanovení HCV antigenu a přítomností virémie – HCV RNA stanovenou kvantitativní PCR (qPCR).

Hypotéza:

1. Stanovení anti-HCV u patientských vzorků séra/plazmy za využití jedné analytické metody (CMIA) je méně specifické než za využití druhé analytické metody (ECLIA).
2. Stanovení HCV Ag u patientských vzorků séra/plazmy za využití jedné analytické metody (ECLIA) je méně specifické než za využití druhé analytické metody (CMIA).
3. Mezi HCV antigenem a množstvím virémie HCV RNA detekované qPCR existuje korelace.

4 Metodika

Praktickou část bakalářské práce jsem prováděla na Ústavu laboratorní medicíny, přesněji na Oddělení klinické mikrobiologie a imunologie (OKMI) FN Brno – Úsek infekční imunologie, kde se screeningové vyšetření HCV nyní vyšetřuje na analyzátoru Architect i2000_{SR}. Měření se zároveň provádí na analyzátoru Cobas Pure, kde se uvažuje o zavedení nové screeningové metody. V případě reaktivního nálezu anti-HCV se konfirmačně testuje metodou Western Blot, pro vyloučení zkřížené/nescifické reaktivity. Ostatní potřebná data a relevantní klinické informace, které jsou potřebné pro porovnání obou metod, jsou čerpány z informačních systémů, jako jsou laboratorní informační systém LaIS a nemocniční informační systém AMIS.

4.1 *Preanalytická fáze*

Příjem a zpracování vzorků

Pro účely vyšetření protilátek a antigenu hepatitidy C přijímá laboratoř vzorky srážlivé nebo nesrážlivé krve, kdy zkumavky pro nesrážlivou krev nejčastěji obsahují například antikoagulans K₃EDTA, citrát sodný nebo heparin. Každý vzorek je přijat společně s žádankou, přičemž je kladen důraz na kontrolu informací uvedených na žádance i na vzorku, aby se předešlo jakékoliv neshodě či záměně pacienta. Na žádance musí být jasně specifikovány všechny relevantní údaje o pacientovi (jméno a rodné číslo), oddělení, odkud byl vzorek poslán, a o odběru materiálu (datum, čas). Pokud jsou údaje neúplné či nesprávné, vše se zapisuje do knihy neshod a neprodleně se informuje příslušné oddělení o potřebě opravy či o nepřijetí vzorku.

Po přijetí se vzorek umístí do centrifugy a stáčí při síle 2093 g a laboratorní teplotě po dobu 10 minut. Tento proces zajišťuje oddělení plazmy nebo séra od buněčné složky krve.

V průběhu stáčení se údaje z žádanky zapisují do laboratorního informačního systému (LaIS). Po zapsání těchto údajů systém automaticky vygeneruje štítek s jedinečným čárovým kódem, který je následně nalepen na sekundární zkumavku a následně je daný vzorek alikvotován. Alikvotování probíhá ručně z primárně stočené zkumavky.

Alikvotovaný vzorek je standardně uchováván při ledničkové teplotě, tj. 2–8 °C, a to po dobu 7 dní, v případě uchování při -20 °C lze skladování prodloužit na 4 týdny. Toto uchovávání zajišťuje, že vzorek zůstane v optimálním stavu pro následné vyšetření či

případné dovyšetření. Je důležité poznamenat, že pokud je požadována doordínávka, vždy musí být poslán požadavek v podobě žádanky s uvedenou informací, že se již materiál nachází v laboratoři.

4.2 Analýza

4.2.1 Architect i2000_{SR} Anti-HCV

Analyzátor ARCHITECT i2000_{SR} od společnosti Abbott představuje zařízení, které je založeno na principu chemiluminiscenční mikročasticové imunoanalýzy (CMIA). ARCHITECT Anti-HCV byl navržen k detekci protilátek proti strukturálním a nestrukturálním proteinům genomu HCV.

Maximální průchodnost přístroje ARCHITECT i2000_{SR} dosahuje až 200 testů za hodinu. S mrtvým objemem 50 µl minimalizuje přístroj ztrátu vzorků. Momentálně je v laboratoři OKMI primárně využíván nejen na screeningové vyšetření v kontextu hepatitidy C, ale i na běžné rutinní či statimové požadavky.



Obrázek 8 Architect i2000_{SR} na OKMI FN Brno (Zdroj: Vlastní)

4.2.1.1 Reagenice, princip a postup vyšetření:

Reagenční Kit ARCHITECT anit-HCV, kat. č. 6C3727 (Abbott Diagnostics)

- *Microparticles* obsahující mikročástice potažené HCV antigenem v MES (kyselina 2-(N-morfolino)-ethansulfonová) pufru.
- *Conjugate*: konjugát obsahující myši anti-IgG/anti-IgM protilátky značené akridiniem v pufru MES. Minimální koncentrace: (IgG) 8 ng/ml/(IgM) 0,8 ng/ml.
- *Assay diluent* obsahující TRIS (tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) pufr se stabilizátory proteinů

Další potřebné reagenzie a materiály (vše Abbott Diagnostics)

- *Pre-Trigger Solution* obsahující 1,32 % peroxid vodíku. (kat. č. 6E5563)
- *Trigger Solution* obsahující 0,35 N hydroxidu sodného. (kat. č. 6C5563)
- *Wash Buffer* obsahující fyziologický roztok s fosfátovým pufrém. (kat. č. 6C5458)
- ARCHITECT Anti-HCV Calibrator (kat. č. 6C37-01)
- ARCHITECT Anti-HCV Controls (kat. č. 6C3710)
- Reakční nádobky ARCHITECT (kat. č. 7C1503)
- Vzorkové nádobky ARCHITECT (kat. č. 7C14101)
- Náhradní vyměnitelná víčka ARCHITECT (kat. č. 4D1901)
- Septum ARCHITECT (kat. č. 4D1803)



Obrázek 9 Reagenční Kit Anti-HCV na 500 testů (Zdroj: ARCHITECT A-HCV(500T), c2024)

Princip

Inicializace testu spočívá v integraci vzorku s rekombinantním antigenem HCV na paramagnetických mikročasticích a následném přidání ředidla. Na tyto mikročastice se selektivně vážou protilátky proti HCV, pokud jsou ve vzorku přítomny. Po sérii oplachů se do systému zavede akridiniem značený anti-lidský konjugát, který se váže na přítomné protilátky. Po posledním oplachu se přidají roztoky Pre-Trigger (peroxid vodíku) a Trigger (hydroxid sodný). Roztok Pre-Trigger vytváří kyselé prostředí a zabraňuje tak předčasnému uvolnění energie a emisi světla. Zabraňuje také agregaci mikročastic a štěpí akridinium z konjugátu navázaného na mikročastice. Po vystavení peroxidu a alkalickému roztoku je akridinium oxidováno a vzniká chemiluminiscenční signál. Intenzita emitovaného světla je pak kvantifikována jako relativní světelné jednotky (RLU), přičemž existuje lineární korelace mezi koncentrací anti-HCV ve vzorku a hodnotou RLU. Identifikace anti-HCV se provádí porovnáním intenzity chemiluminiscence s referenčním limitem, který byl stanoven během kalibrace. (Abbott Diagnostics, 2023b)

Postup

- Po standardní údržbě a ověření dostupnosti potřebných reagensů a materiálů přecházíme k instalaci reagenčního kitu ARCHITECT Anti-HCV do reagenčního karuselu. Před vložením je nezbytné pečlivě promíchat všechny lahvičky s reagensy, abychom zajistili rovnoměrné rozptýlení mikročástic. Provedeme to tak, že lahvičky převrátíme 30krát a ujistíme se, že jsou mikročástice řádně rozptýleny. Poté nahradíme běžná víčka septy, aby byl možný průchod jehly do reagentie. Pro vložení reagentie do analyzátoru musí být přístroj v režimu „Připraven“, kdy lze po otevření víka rotovat karuselem a umístit reagenční lahvičky na správné pozice, které jsou označeny barvami, odpovídajícími těm na lahvičkách. Následně zadáme „Skenovat“, kdy si analyzátor načte příslušné lahvičky a jejich hladiny (zbývající testy). Nakonec označíme moduly do režimu „Zpracovat“ pro inicializaci přístroje na následné zpracování.
- Po instalaci metody je nutné provést kalibraci metody, což vede k vytvoření aktivní kalibrační křivky. Kalibrace je dále nezbytná při použití nové šarže reagensů, po vypršení platnosti kalibrační křivky, po vložení nových reagensů se stejnou šarží nebo pokud hodnoty kontroly nevyhovují stanoveným kritériím. Každá metoda vyžaduje určitý počet kalibrátorů, které je nutné použít. Kalibrace se připraví přidáním požadovaného objemu z originální lahvičky kalibrátoru od firmy ABBOTT do sekundárních mikrozkušavek. Objednání kalibrace se provádí ručně zadáním ID stojánku, příslušné pozice ve stojanu a výběrem metody, kterou chceme kalibrovat v sekci „Objednání kalibrace“. Vložením stojánku s kalibrátory přístroj začne vzorky zpracovávat, a poté automaticky stanoví cut-off hodnotu pro danou šarží.
- Interní kontroly kvality měříme každé ráno po provedení denní údržby před zpracováním běžných vzorků od pacientů nebo po zmíněné kalibraci. Je nezbytné, aby hodnoty těchto kontrolních vzorků spadaly do přesně stanovených rozmezí dle výrobce. Kontroly, označené čárovým kódem, umístíme do nosiče a vložíme je do přístroje. Můžeme je také zadat ručně, stejně jako kalibrátory, v sekci "Objednání kontroly".
- Séra/plazmy pacientů s čárovým kódem před zařazením do stojanu prohlédneme, zda nejsou například silně hemolytické, zjevně mikrobiálně kontaminované,

neobsahují bublinky/pěnu, či neobsahují jiné pevné částice. Po ověření kvality vzorku vkládáme stojan se vzorky s viditelným čárovým kódem do analyzátoru (obr. 10), který si přes LaIS načte požadované vyšetření. Vyšetření lze provést i manuálním zadáním přes „Objednání pacienta“.

- Informace o zpracování jednotlivých vzorků nalezneme v nabídce „Stav objednávky“. Pokud je po dokončení analýzy vzorek reaktivní, musíme ho dále uvolnit k odeslání do LaIS, ostatní nereaktivní vzorky jsou již automaticky odesílány do LaIS bez předchozí nutnosti manuálního uvolnění z analyzátoru.



Obrázek 10 Stojan se vzorky – vložení vzorků do analyzátoru Architect i2000_{SR} (Zdroj: Vlastní)

4.2.1.2 Interpretace výsledků

Analyzátor vypočítává výsledek pro každý vzorek a kontrolu jako poměr hodnoty (RLU) vzorku k hodnotě (RLU) cut-off v jednotkách S/CO (signal to cut off).

Hodnota cut-off (RLU) = 0,074 x průměrná hodnota (RLU) kalibrátoru 1.

Vzorky s hodnotami < 1,00 S/CO jsou interpretovány jako nereaktivní výsledky ARCHITECT Anti-HCV testu a není nutné provádět další testování.

Vzorky s hodnotami $\geq 1,00$ S/CO jsou interpretovány jako reaktivní výsledky ARCHITECT Anti-HCV testu.

Všechny vzorky původně vykazující reaktivní výsledky by měly být opětovně testovány v duplikátech. Pokud obě hodnoty opakovaného testu vykazují nereaktivitu, je vzorek považován za nereaktivní na přítomnost anti-HCV. V případě, že je alespoň jedna z hodnot opakovaného testu reaktivní, je vzorek považován za opakovaně reaktivní na přítomnost anti-HCV a musí být potvrzen doplnkovými metodami (WB, PCR).

4.2.2 Architect i2000_{SR} HCV Ag

Metoda Architect HCV Ag je dvoukroková imunoanalýza ke kvantitativnímu stanovení core antigenu viru hepatitidy C v plazmě nebo séru, využívající technologii CMIA.

4.2.2.1 Reagenice, princip a postup vyšetření:

Reagenční kit ARCHITECT HCV Ag kat. č. 6L4729 (Abbott Diagnostics)

- *Microparticles* obsahující mikročástice potažené myší anti-HCV protilátkou v 400 mM bikarbonátu, 50 mM TRIS pufru se stabilizátorem bílkovin (hovězí)
- *Conjugate* konjugát myších anti-HCV protilátek značených akridiniem v 80 mM BIS-TRIS se stabilizátorem proteinu (hovězího)
- *Assay specific diluent*: specifický ředící roztok obsahující 1,46 N NaOH
- *Pre-Treatment Reagent 1*: Přípravná reagencie 1 obsahující 0,83 N HCl
- *Pre-Treatment Reagent 2*: Přípravná reagencie 2 obsahující 0,83 N HCl
- *Specimen Diluent* roztok na ředění vzorků HCV Ag obsahující fosfátový pufr s proteinovým (koňské sérum) stabilizátorem.

Další potřebné reagenice a materiály (vše Abbott Diagnostics)

- ARCHITECT HCV Ag Calibrators (kat. č. 6L4702)
- ARCHITECT HCV Ag Controls (kat. č. 6L4711)
- Ostatní potřebné reagenice a materiály jsou stejné, jako u metody ARCHITECT Anti-HCV (kapitola 4.2.1.1)

Princip

V prvním kroku jsou vzorek a přípravné reagensie 1 a 2 (kyselina chlorovodíková) smíchány, tato prefáze zajišťuje zlepšení vazby mezi antigenním determinantem a detekčním protilátkovým reagentem. Alikvótní podíl připraveného vzorku se nasaje a přenese do nové reakční nádoby. Postup pokračuje totožnými kroky jako u Architect anti-HCV s tím rozdílem, že mikročástice jsou potažené anti-HCV namísto specifického antigenu. (Abbott Diagnostics, 2023a)

Postup

- Posup probíhá totožně s postupem u metody ARCHITECT Anti-HCV (kapitola 4.2.1.1) s rozdílem objednání a zadání odlišného parametru a tím je HCV Ag.

4.2.2.2 Interpretace výsledků

Koncentrace HCV antigenů se stanoví pomocí kalibrační křivky. Při koncentraci nižší než 3 fmol/l se vzorky považují za nereaktivní. Pokud je naměřená koncentrace rovna nebo vyšší než 3 fmol/l, vzorky jsou kategorizovány jako reaktivní. Avšak u vzorků s koncentrací v rozmezí od 3 fmol/l do méně než 10 fmol/l se doporučuje provést duplicitní retestování. Pokud oba opakované testy dávají nereaktivní výsledky, vzorek je považován za nereaktivní na HCV Ag. Pokud však jeden nebo oba opakované testy poskytují reaktivní výsledky, vzorek je klasifikován jako reaktivní na HCV Ag.

4.2.3 Elecsys HCV Duo

Elecsys HCV Duo od firmy Roche je elektrochemiluminiscenční imunostanovení (ECLIA) určené pro použití na analyzátoch Cobas, v našem případě Cobas Pure (modul e402), pro kvalitativní detekci jádrového antigenu viru hepatitidy C (HCV Ag) a protilátek proti HCV (anti-HCV) *in vitro* v lidském séru a plazmě.

Stanovení Elecsys HCV Duo se skládá ze 2 testovacích modulů (HCV Ag a anti-HCV), které využívají peptidy a rekombinantní antigeny představující jádrové proteiny a proteiny NS3 a NS4 pro detekci protilátek proti HCV a monoklonální protilátky pro detekci HCV jádrového antigenu. Prostřednictvím stanovení Elecsys HCV Duo lze

z jednoho vzorku současně detekovat jádrový antigen HCV i protilátky proti HCV ve 2 oddělených, ale paralelních reakcích. Výsledek hlavního testu Elecsys HCV Duo je automaticky vypočítán analyzátozem, přičemž jsou přístupné i jednotlivé podvýsledky anti-HCV a HCV Ag. (Roche Diagnostic, 2023)



Obrázek 11 Cobas Pure na OKMI FN Brno (Zdroj: vlastní)

4.2.3.1 Princip a postup vyšetření

Reagencie Elecsys HCV Duo kat. č. 08110697190 (Roche Diagnostics)

- *Cobas e pack 1* obsahující přípravnou reagenii s hydroxidem sodným a pH 13, značenou jako PT.
- *Cobas e pack 2* rozdělen na tři části (M, R1, R2), kdy „M“ část obsahuje streptavidinem potažené mikročástice, část „R1“ obsahuje biotinylované anti-HCV v TRIS pufru a část „R2“ obsahuje biotinylované anti-HCV značené rutheniovým komplexem v TRIS pufru.

- *Cobas e pack 3* též rozdělen do tří částí (M, R1, R2), kdy „M“ část obsahuje streptavidinem potažené mikročástice, část „R1“ obsahuje biotinylované HCV-specifické antigeny v HEPES ([4-(2-hydroxyetyl)-piperazin]-etansulfonová kyselina) pufru a část „R2“ obsahuje HCV-specifické antigeny značené rutheniovým komplexem opět v HEPES pufru.

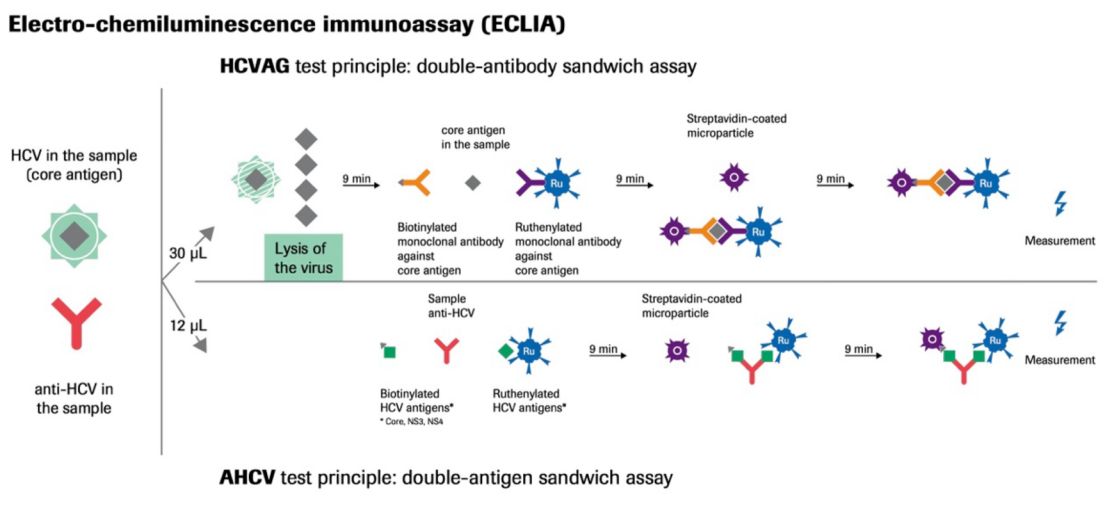
Další potřebný materiál (vše Roche Diagnostics)

- HCVDUO kalibrátory (Cal1, Cal2, Cal3, Cal4) dodávané k reagenii jako součást balení.
- *PreciControl HCV Duo* (kat. č. 08335923190)
- Stojany Cobas Pure
- *ProCell II M* obsahující fosfátový pufr 300 mmol/l a tripropylamin 180 mmol/l s použitím jako systémový roztok pro vytváření elektrochemického signálu. (kat. č. 06908799190)
- *CleanCell M* systémový čistící roztok obsahující hydroxid draselný (kat. č. 04880293190)

Princip

Jedná se o stanovení založené na sendvičové imunoanalýze, tato stanovení se provádí s celkovou dobou trvající 27 minut. Počáteční příprava zahrnuje inkubaci 30 µl analyzovaného vzorku s 15 µl přípravného roztoku k uvolnění cílového HCV jádrového antigenu. První fáze inkubace HCVAG zahrnuje interakci vzorku s biotinylovanými a s rutheniem značenými monoklonálními anti-jádrovými protilátkami, což vede k vytvoření sendvičového komplexu. Paralelně v jiné nádobce probíhá první inkubace pro metodu AHCV (stanovení anti-HCV), kde 12 µl vzorku reaguje s biotinylovanými HCV-specifickými antigeny a antigenními komponentami značenými rutheniovým komplexem. Druhá inkubace obou vzorků zahrnuje přidání streptavidinem potažených mikročástic pro imobilizaci komplexů na solidní fázi. Reakční směs je nasátá do měřicí cely, kde jsou mikročástice s navázanými komplexy zachyceny magnetickým polem.

Nevázané složky jsou odstraněny roztokem ProCell II M. Přivedené napětí na pracovní elektrodě vyvolá chemiluminiscenční emisi fotonů, která se měří fotonásobičem. Výsledky se stanovují automaticky softwarem porovnáním elektrochemiluminiscenčního signálu získaného ze vzorku s hodnotami cut-off – dříve stanovenými kalibračními hodnotami. (Roche Diagnostic, 2023)



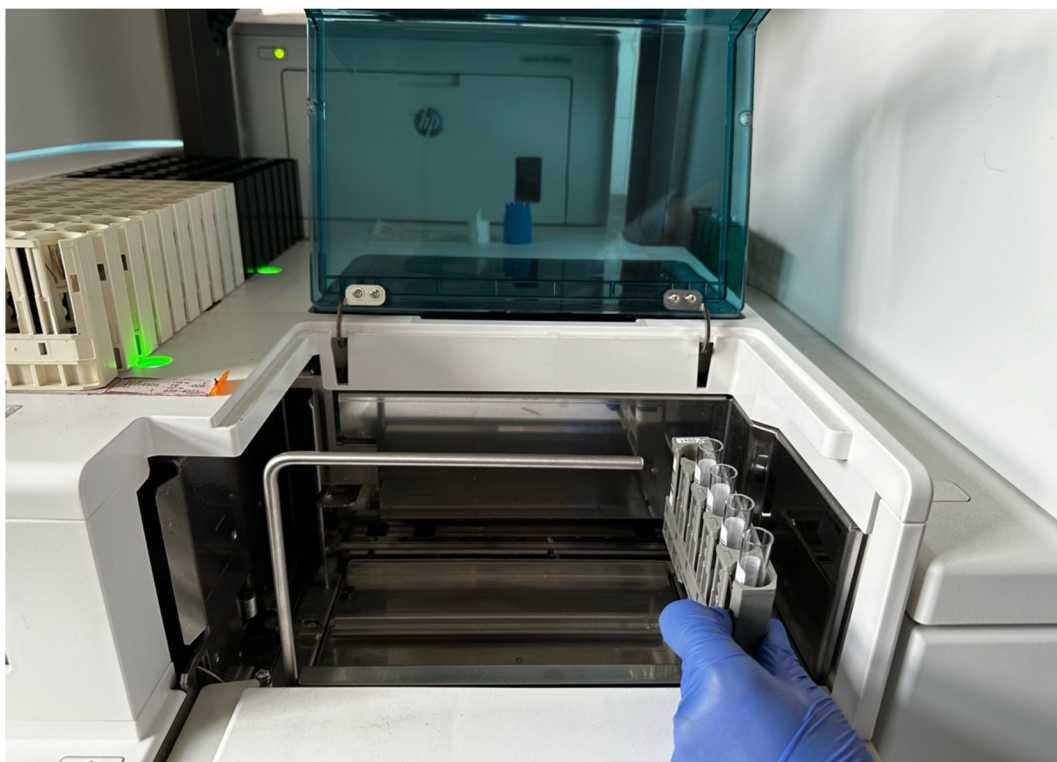
Obrázek 12 Schéma reakce – nahoře HCV Ag dole AHCV (Zdroj: Roche diagnostic, 2022)

Postup

- Proces spuštění analytického přístroje Cobas Pure začíná inicializací, kterou přístroj provádí bez nutnosti obsluhy. Jelikož se jedná o novou metodu, musí se před spuštěním stáhnout metodika do přístroje. Přístroj musí být v režimu „Stand by“. V systému vybereme v sekci „Pre-Routine“ možnost „Download Required Items“. Zadáním šarže do „Application“ nalezneme požadovanou metodu. Po výběru potřebných položek potvrdíme volby stisknutím „Continue“ a stažení zahájíme tlačítkem „Download“. Stejný postup provedeme i u kontrol a kalibrátorů, akorát s tím rozdílem, že vybereme záložku „Calibrator“ pro kalibrátory a „QC“ pro kontroly. Tím zajistíme, že přístroj pracuje s aktuálními kalibracemi a kontrolními materiály.
- Po stáhnutí potřebných parametrů vložíme tři kazety (pro metodu HCVDUO) do modulu cobas e402 tak, že zvedneme modré víko a v levé části otevřeme bílý kryt reagenčního kotouče a na libovolnou pozici reagenzie vložíme. Po vložení

reagencií klikneme v sekci „Reagents“ na „Reagents registration“ pro registraci reagencií v analytické jednotce.

- Před začátkem měření se musí provést kalibrace, kalibrátory se umístí do černého stojánku (stojánek určený pro kalibrátory) čárovým kódem ven. Jelikož se jedná o novou metodu, analyzátor si kalibraci naplánuje sám a můžeme vložit kalibrátory do podávacího stojanu (viz obr. č. 14). Po úspěšné kalibraci provedeme měření interních kontrol kvality pomocí *PreciControl* HCV Duo, kdy kontrolní lahvičky vložíme do bílých stojánků (určených pro kontroly), aby čárový kód směřoval ven. Na hlavní obrazovce vybereme tlačítko „QC“ najdeme HCVDUO, potvrdíme tlačítkem „confirm“ a zadáme „save“. Nyní se stojánky vloží do podávacího stojanu (obr. 13). Validní výsledky kontrol jsou klíčové pro další měření.
- Vzorky sér/plazmy se vkládají do šedého stojánku (určený pro vzorky) opět čárovým kódem tak, aby byl viditelný. Vyšetření si načte analyzátor z LaIS a následně výsledky po dokončení sám do LaIS odešle. Lze si vzorky zadat i manuálně přes tlačítkou „Routine“ a následným výběrem „Order tests“, kde mohu zadat pacienty a požadovaný test k provedení.



Obrázek 13 Vkládání vzorků do Cobas Pure (Zdroj: vlastní)

4.2.3.2 Interpretace výsledků

Interpretace výsledků testů Elecsys HCV Duo se řídí hodnotou COI (Cut-Off Index). Pokud je COI nižší než 1,0, test je považován za negativní, což značí, že pacient není reaktivní na HCV antigenní test ani na protilátky proti HCV a další testování není potřebné. COI rovný nebo vyšší než 1,0 znamená reaktivní výsledek jednoho z testů nebo i obou, což vyžaduje opakované testování ve dvojitém měření pro potvrzení reaktivity. V případě opakovaného reaktivního výsledku se doporučuje další potvrzovací testování, jako je imunoblot nebo potvrzení HCV RNA.

Pro upřesnění jsou k nahlédnutí podvýsledky HCVAG (HCV Ag) a AHCV (anti-HCV) s jednotlivými COI hodnotami pro daný test.

4.3 Sběr pacientů

V rámci studie, zaměřené na porovnávání efektivity a analytických vlastností dvou diagnostických metod pro detekci a specifikaci hepatitidy C na dvou různých analyzátorech, byl proces výběru pacientů realizován od 25. 10. 2022 a charakterizoval se svou komplexností a postupným zaměřením na specifické skupiny pacientů. V počáteční fázi (1. etapa testování) jsme vybírali náhodné pacienty podstupující screening na hepatitidu C, nicméně se zaměřením na reaktivní výsledky anti-HCV stanovené metodou CMIA na analyzátoru Architect, jelikož jsme nepředpokládali výskyt falešně negativních výsledků anti-HCV, které by bylo potřeba oběma metodami srovnávat.

V druhé etapě jsme výběr soustředili pouze na pacienty se slabě reaktivními výsledky testů pro stanovení anti-HCV a HCV Ag na analyzátoru Architect, což nám umožnilo detailněji prozkoumat citlivost a nespecifické reakce dvou různých metod. Na základě testování v první etapě jsme si tedy stanovili tato kritéria pro výběr vzorků: pacienty reaktivní s hodnotami anti-HCV nižšími než 7 S/CO a hodnotami HCV Ag nižšími než 500 fmol/l (obojí metodou CMIA), což odráží zaměření na pacienty s nižší virovou náloží nebo nespecifické interference.

Paralelně byl proveden také výběr pacientů s diagnostikovanou hepatitidou C, kteří měli kvantitativně potvrzené PCR s virémií nižší než 1 000 000 IU/ml. Tento specifický výběr jsme uskutečnili pro porovnání pravdivosti vyšetřovacích metod na dvou zkoumaných

analyzátorech. Tento přístup umožnil získat vzorky od pacientů na různých úrovních infekce, s různou virální náloží a odlišnou anamnézou.

5 Výsledky

5.1 Vyšetření vzorků na protilátky proti hepatitidě C

Tabulka číslo 1 nám znázorňuje šest různých variant získaných výsledků. HCVDUO (ECLIA) zde reprezentuje celkový výsledek z analyzátoru Cobas Pure, tedy HCV Ag / anti-HCV. Sloupec a-HCV (CMIA) znázorňuje výsledky z analyzátoru Architect i2000_{SR}. Tyto metody jsou v celé práci potvrzovány metodami WB přesněji RecomLine HCV IgG od firmy Mikrogen anebo metodou PCR za použití přístroje Alinity m od firmy Abbott.

Celkové vyhodnocení všech vyšetřených vzorků na protilátky proti HCV

Tabulka 1 Varianty výsledků stanovení protilátek proti hepatitidě C

| a-HCV (CMIA) | HCV DUO (HCV Ag/Ab) (ECLIA) | Konfirmační metody | | Počet vzorků |
|----------------------|-----------------------------------|--------------------|-----------|--------------|
| | | WB a-HCV | PCR | |
| reaktivní | reaktivní | pozitivní | X | 22 |
| reaktivní | reaktivní | X | pozitivní | 41 |
| reaktivní | nereaktivní | negativní | X | 15 |
| reaktivní | reaktivní | negativní | X | 1 |
| nereaktivní | nereaktivní | X | X | 3 |
| reaktivní | reaktivní | hraniční | pozitivní | 2 |
| Celkem vzorků | | | | 84 |

(Zdroj: Vlastní)

V prvním řádku jsou uvedeny výsledky 22 pacientů, kteří měli shodně reaktivní HCVDUO i a-HCV a byli potvrzováni na specifické protilátky pomocí imunoblotu. V druhém řádku je 41 pacientů opět shodně s reaktivitou v HCVDUO a a-HCV, nyní konfirmačně potvrzenou stanovením HCV RNA pomocí PCR, tedy PCR pozitivní. 15 vzorků nám vyšlo pouze s reaktivním a-HCV a nereaktivním HCV DUO, kdy WB bylo

negativní a specifické protilátky tedy nebyly potvrzeny, zde se tedy jednalo o nespecifickou reaktivitu na analyzátoru Architect i2000_{SR}. Ve čtvrtém řádku nám jediný vzorek vyšel reaktivně oběma porovnávanými metodami, i když výsledkem WB byl negativní, v obou případech se tedy jednalo o nespecifickou reaktivitu anti-HCV. V náhodném výběru jsme měli i 3 nereaktivní vzorky, u kterých se další konfirmační testy neindikují, proto je budeme považovat za správně negativní i bez konfirmace. U 2 pacientů nám vycházela reaktivita u obou porovnávaných metod, kdy konfirmační test imunoblotem vycházel hraničně, a proto potvrzení pravdivosti jsme stanovili na základě pozitivní PCR. Celkem bylo provedeno 84 testů z čehož 81 vzorků bylo potvrzených na přítomnost či nepřítomnost protilátek proti hepatitidě C. U 68 vzorků byla správně stanovena reaktivita anti-HCV oběma srovnávanými metodami. V 15 případech byla stanovena nespecifická reaktivita anti-HCV na analyzátoru Architect i2000_{SR} metodou CMIA, zatímco výsledky na analyzátoru Cobas Pure e402 metodou ECLIA byly správně stanoveny jako nereaktivní. V jednom případě se vyskytla nespecifická reaktivita u obou srovnávaných metod.

Vyhodnocení vzorků pozitivních na anti-HCV

Pro specifitější porovnání můžeme v tabulce č. 2 vidět rozdělení vyšetření HCV DUO na podvýsledek stanovení protilátek (HCV Duo Ab) a celkový výsledek (HCV DUO). Vzorky jsou rozděleny do dvou etap. První etapa jsou náhodně vybrané reaktivní vzorky sér stanovené CMIA (Architect i2000_{SR}) která se rutinně používá pro stanovení anti-HCV a vždy jsou potvrzené minimálně jednou konfirmační metodou, primárně Western blotem, pokud WB vyšel hraničně, což se stalo u dvou případů, je určena pravdivost metody na základě výsledků stanovení HCV RNA metodou PCR, která v obou případech byla pozitivní (viz tabulka č. 1). Druhá etapa se skládá z vybraných vzorků pacientů, kteří již měli diagnostikovanou hepatitidu C a měli pozitivní PCR s nižší virémií, než je 1 000 000 IU/ml, v tomto případě byla měřena plazma.

Tabulka 2 Zastoupení správně pozitivních vzorků na anti-HCV

| Výběr (+) | Počet vzorků | a-HCV (CMIA) | HCV Duo Ab (ECLIA) | HCV DUO (ECLIA) |
|-----------|--------------|---|--------------------|------------------|
| | | počet správně pozitivních danou metodu / N* | | |
| 1. etapa | 24 | 24/24 (100 %) | 24/24 (100 %) | 24/24 (100 %) |
| 2. etapa | 41 | 41/41 (100 %) | 41/41 (100 %) | 41/41 (100 %) |
| celkem | 65 | 65/65 (100 %) | 65/65 (100 %) | 65/65 (100 %) |

(Zdroj: Vlastní)

*N – celkový počet správně pozitivních

Z této tabulky vyplývá, že všechny výsledky testování byly správně identifikovány jako pozitivní, což potvrzuje vysokou klinickou senzitivitu použitých metod v našem měření. Tento výsledek je v souladu s definicí klinické senzitivity, která se vztahuje k počtu správně identifikovaných pozitivních vzorků

Vyhodnocení vzorků negativních na anti-HCV

Jak už jsem zmínila v kapitole týkající se sběru pacientů (kapitola 4.3), pro srovnání obou metod jsme si vybírali převážně vzorky s reaktivním výsledkem CMIA, pro možnost zhodnocení specifity. Proto je důležité poznamenat, že u výsledků uvedených v tabulce číslo 3 se hodnoty naměřené metodou CMIA pohybovaly pouze do 3 S/CO, což značí slabou reaktivitu, u které je předpoklad, že confirmace by mohla ukázat negativní výsledek. Nejedná se tedy primárně o výběr vzorků nereaktivních.

Tabulka 3 Zastoupení správně negativních vzorků na anti-HCV

| Výběr (-) | Počet vzorků | a-HCV (CMIA) | HCV Duo Ab (ECLIA) | HCV DUO (ECLIA) |
|-----------|--------------|---|-----------------------|--------------------|
| | | počet správně pozitivních danou metodu / N* | | |
| 1. etapa | 16 | 3/19 (15,79 %) | 18/19 (94,74 %) | 18/19 (94,74 %) |
| 2. etapa | 0 | X | X | X |
| celkem | 16 | 3/19 (15,79 %) | 18/19 (94,74 %) | 18/19 (94,74 %) |

(Zdroj: Vlastní)

*N – celkový počet správně negativních

K pozorování negativních výsledků máme pouze 19 vzorků z první etapy, a to z toho důvodu, že druhá etapa byla cílená především na pozitivní diagnostikované pacienty a nebyl zde žádný negativní pacient. Základním výstupem této tabulky je, že většina slabě reaktivních výsledků stanovených metodou a-HCV CMIA nebylo confirmováno Western blotem, který byl negativní (pacient neměl specifické protilátky prokázané), a všechny tyto vzorky vykazovaly nespecifickou reaktivitu. Zmíněná nespecifická reaktivita je asociována s nízkými hodnotami u těchto měření, jak je zmíněno výše. Nicméně tento nálezní nijak nesnižuje význam skutečnosti, že s vysokou pravděpodobností docházelo ke zkříženým reaktivitám, současně totiž byly u těchto vzorků zjištěné i jiné potenciálně interferující látky, jako jsou protilátky proti CMV (*cytomegalovirus*), EBV (*Epstein-Barr virus*), TP (*Treponema pallidum*) či jiným infekčním hepatitidám. U metody HCV DUO, ať už se jednalo o podvýsledek či celkový výsledek, byla nespecifická reaktivita pouze v jednom případě, což ukazuje na významně vyšší specificitu v tomto šetření.

5.2 Vyšetření vzorků na HCV antigen.

V tabulce číslo 4 můžeme vidět 5 variant výsledků, kdy HCVDUO (ECLIA) zastupuje celkový výsledek (HCV Ag / anti-HCV) z přístroje Cobas Pure a HCV Ag (CMIA) opět přístroj Architect i2000SR. Pravdivost je určena na základě výsledků stanovení HCV RNA metodou PCR.

Celkové vyhodnocení všech vyšetřených vzorků na HCV Ag

Tabulka 4 Varianty výsledků u vyšetření HCV Antigenu

| HCV Ag (CMIA) | HCVDUO (HCV Ag/Ab) (ECLIA) | Konfirmační metoda | Počet vzorků |
|----------------------|----------------------------|--------------------|--------------|
| | | PCR | |
| reaktivní | reaktivní | pozitivní | 38 |
| nereaktivní | reaktivní | pozitivní | 16 |
| nereaktivní | reaktivní | negativní | 3 |
| nereaktivní | nereaktivní | negativní | 3 |
| reaktivní | nereaktivní | negativní | 1** |
| Celkem vzorků | | | 61 |

(Zdroj: Vlastní)

** zajímavý případ, kterému se budu věnovat v kazuistice (kapitola 5.4), a proto nebude zahrnut v detailnějším porovnávání.

První řádek ukazuje, že 38 vzorků bylo reaktivních oběma srovnávanými metodami a pozitivita byla potvrzena metodou PCR. U 16 vzorků bylo reaktivní pouze HCVDUO a pozitivita byla u všech vzorků potvrzena PCR. U 3 vzorků byla též reaktivní metoda HCVDUO, ale HCV nebyl nedetekován PCR. U dalších 3 pacientů vyšla veškerá vyšetření nereaktivní a negativní. V poslední variantě výsledků vyšel jediný vzorek reaktivně pouze metodou HCV Ag (CMIA) a nebyl zahrnut v detailnějším porovnání viz tabulka č.6. Celkově tedy bylo vyšetřeno na HCV antigen 61 vzorků z nichž je 60 jich je dále detailněji popsáno.

Vyhodnocení vzorků pozitivních na HCV Ag

Tabulka 5 je zaměřena pouze na vzorky s prokázanou pozitivitou pomocí qPCR. Můžeme si všimnout obdobného detailnějšího rozdělení jako u protilátek (tab. 2, tab. 3) s tím rozdílem, že je přidán a posuzován podvýsledek HCV Duo Ag zvlášť a k tomu celkový výsledek HCV DUO, který se interpretuje viz interpretace výsledků (kapitola 3.2.3.2).

Tabulka 5 Zastoupení správně pozitivních vzorků na HCV Ag

| Výběr (+) | Počet vzorků | HCV Ag (CMIA) | HCV Duo Ag (ECLIA) | HCV DUO (HCV Ag/Ab) (ECLIA) |
|-----------|--------------|---|--------------------|-----------------------------|
| | | počet správně pozitivních danou metodu / N* | | |
| 1. etapa | 13 | 13/13 (100 %) | 6/13 (46,2 %) | 13/13 (100 %) |
| 2. etapa | 41 | 25/41 (61,0 %) | 9/41 (21,9 %) | 41/41 (100 %) |
| celkem | 54 | 38/54 (70,37 %) | 15/54 (27,77 %) | 54/54 (100 %) |

(Zdroj: Vlastní)

*N – celkový počet správně pozitivních

Výběr vzorků je opět rozdělen do dvou etap. První etapa jsou náhodné vzorky, vyšetřované převážně ze séra, kdy se virémie pohybovala od 8 000 IU/ml a výše. Druhá etapa jsou vzorky cíleně vybrané s diagnostikovanou hepatitidou C, jak je detailněji popsáno v kapitole týkající se sběru pacientů (kapitola 4.3), s významně nižší virémií, která začínala už na 30 IU/ml. Zde jsou vyšetřované pouze vzorky plazmy, ale nepředpokládáme vliv použitého materiálu na výsledky vyšetření. Ze třinácti vzorků v první etapě byla reaktivita podvýsledku HCV Duo Ag (ECLIA) přítomna pouze u šesti vzorků, nicméně celkové HCV DUO mělo výsledek reaktivní, tzn. reaktivní byl v těchto případech podvýsledek HCV Duo anti-HCV. Metoda HCV Ag (CMIA) byla správně reaktivní u všech 13 vzorků. Ve druhé etapě už je tomu trochu jinak. Metoda HCV Duo Ag (ECLIA) byla správně reaktivní pouze u 9 vzorků ze 41 vyšetřovaných, což odpovídá necelým 22 % v tomto měření. Metoda HCV Ag (CMIA) správně stanovila reaktivitu u 25 vzorků, což odpovídá významně vyšší senzitivitě v tomto měření (61 % správně reaktivních výsledků) oproti metodě ECLIA. V případě celkové interpretace výsledku

metodou HCV DUO jsou však všechny výsledky správně reaktivní, a to díky přítomnosti a detekci protilátek anti-HCV. Je třeba konstatovat, že test HCV Ag (CMIA) vykazoval ve druhé etapě sníženou senzitivitu ve srovnání s první etapou, což se dalo očekávat, jelikož všechny vzorky, které byly ve druhé etapě na tento test nereaktivní, měly nízké hodnoty HCV RNA (qPCR), a to pod 17 300 IU/ml. Pokud bychom vynechali protilátky a zaměřili se pouze na antigen, tak na přístroji Architect i2000SR vyšetření HCV Ag (CMIA) vykazuje vyšší senzitivitu než podvýsledek HCV Duo Ag vyšetřený na Cobas Pure

Vyhodnocení vzorků negativních na HCV Ag

Tabulka 6 Zastoupení správně negativních vzorků na HCV Ag

| Výběr (-) | Počet vzorků | HCV Ag (CMIA) | HCV Duo Ag (ECLIA) | HCV DUO (ECLIA) |
|-----------|--------------|---|--------------------|---------------------------|
| | | počet správně pozitivních danou metodu / N* | | |
| 1. etapa | 6 | 6/6 (100 %) | 6/6 (100 %) | 3/6 (-) ^{***} |
| 2. etapa | 0 | X | X | X |
| celkem | 6 | 6/6 (100 %) | 6/6 (100 %) | 3/6 (-) ^{***} |

(Zdroj: Vlastní)

*N – celkový počet správně negativních

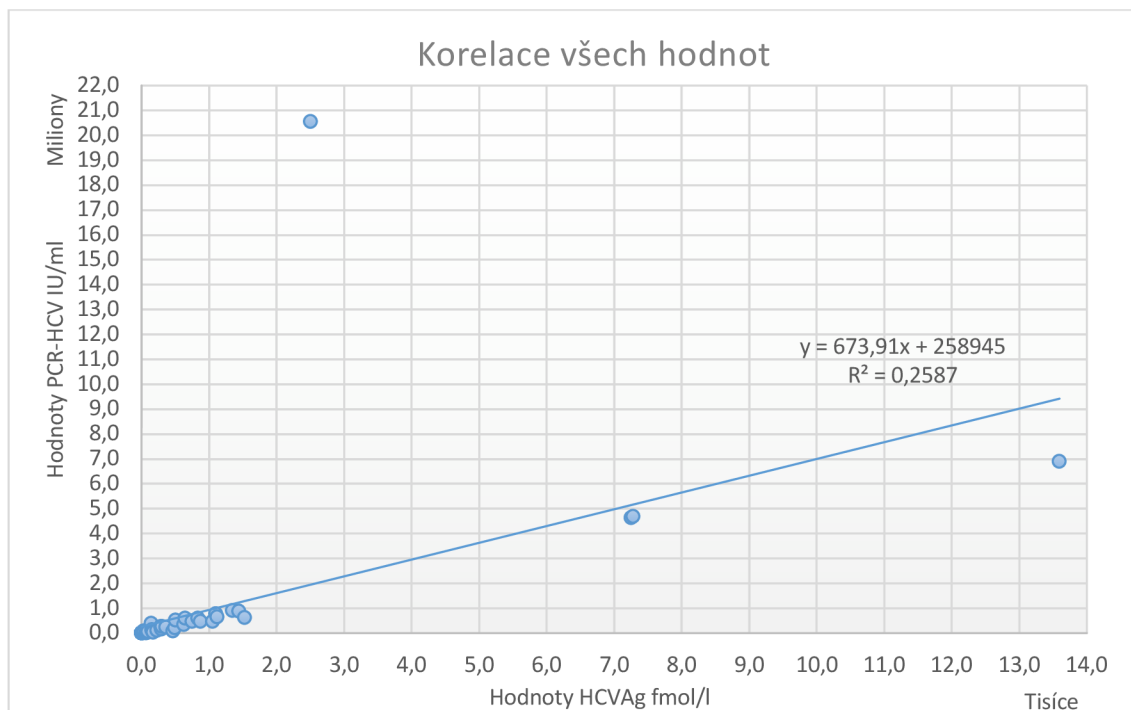
*** – Hodnocení je irelevantní z důvodu přítomnosti anamnestických protilátek, tedy správně reaktivního výsledku, u 3 z 6 vzorků

U 6 negativních vzorků z náhodného výběru byla správně stanovena nereaktivita HCV Ag oběma srovnávanými metodami: HCV Ag na Architect i2000SR i podvýsledek HCV antigenu u HCV DUO. Celkový výsledek HCV Duo byl ve třech případech správně reaktivní, jelikož se v tomto případě jednalo o přítomnost anamnestických protilátek anti-HCV, jež byly potvrzeny

5.3 Korelace HCV Ag a PCR

Korelaci jsem vyhodnocovala mezi kvantitativní metodou ARCHITECT HCV Ag a kvantitativním PCR, Výpočet Pearsonova korelačního koeficientu (r) byl proveden v programu MS Excel pomocí funkce CORREL. Pro stanovení významnosti korelace bylo provedeno testování hypotézy o nulové korelaci dvou náhodných veličin (testová statistika) dle vzorce: $t = r \sqrt{\frac{n-2}{1-r^2}}$. Výsledná hodnota testové statistiky t byla porovnána s kvantilem Studentova t rozložení na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

V korelaci (graf 1) je zahrnuto 59 vzorků od nedetekovatelné RNA po hodnotu 20 551 388 IU/ml.

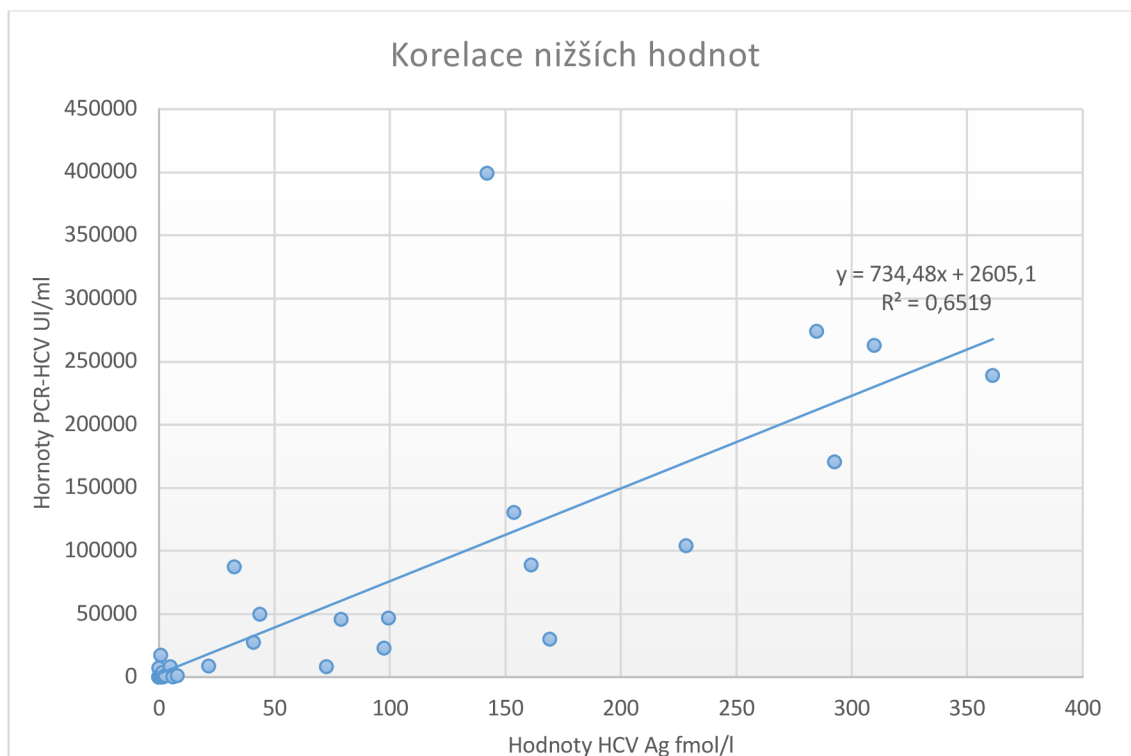


Graf 1 Korelace mezi HCV Ag a HCV RNA (Zdroj: Vlastní)

Na ose X jsou hodnoty HCV Ag od 0 fmol/l do 13 595 fmol/l na ose Y jsou hodnoty PCR v rozmezích uvedených výše.

Výpočet hodnoty korelace, která vyšla zaokrouhleně na $r = 0,51$, značí středně kladnou asociaci mezi proměnnými, avšak zároveň existuje mnoho dalších faktorů, které mohou ovlivňovat chování obou proměnných. Statistická významnost korelace byla potvrzena ($p < 0,05$), kdy $t = 4,341 > 2,004 = t_{0,975}^{(55)}$.

Vzhledem k tomu, že hodnota korelačního koeficientu je silně ovlivněna odlehlými hodnotami, byl výpočet proveden také pro oblast s nižšími hodnotami výsledků měření, kde je předpoklad vyšší přesnosti měření a klinické významnosti (graf 2).



Graf 2 Korelace nižších hodnot HCV Ag a HCV RNA (Zdroj: Vlastní)

Vybrané vzorky (N = 41) v tomto grafu se u PCR pohybovaly v rozmezí od nedetekovatelné RNA do 398 950 IU/ml a HCV Ag bylo v rozmezí od 0 do 361 fmol/l. Zde je už zřetelnější na první pohled, že síla korelace mezi HCV RNA (osa Y) a HCV Ag (osa X) je silná, což můžeme posuzovat i z výpočtu hodnoty korelace, která vyšla $r = 0,81$. Byla také potvrzena statistická významnost korelace ($p < 0,05$), kdy $t = 8,096 > 2,021 = t_{0,975}^{(35)}$.

5.4 Kazuistika

Muž, 39 let

Pacient byl přijat na vyšetření s příznaky ikteru a v anamnéze uvedl problémy spojené s abuzusem alkoholu. Hlavním cílem vyšetření bylo objasnit etiologii jaterní cirhózy. Počáteční laboratorní testy prokázaly mírně zvýšené hodnoty alaninaminotransferázy

(ALT), zvýšené hodnoty gamma-glutamyltransferázy (GGT), aspartátaminotransferázy (AST), alkalické fosfatázy (ALP) a bilirubinu, což naznačovalo poškození jater. Etiologie byla připsána alkoholickému poškození jater (ALD).

V rámci serologického vyšetření byl pacient testován na přítomnost protilátek proti HCV a na HCV antigen (Ag) rutinně používanou metodou CMIA, přičemž oba testy vyšly reaktivně, což naznačovalo možnou infekci HCV. Konfirmační test Western blotu pro anti-HCV vyšel negativní čili specifické protilátky nebyly potvrzeny. Polymerázová řetězová reakce (PCR) pro HCV též vyšla negativně. Další testování metodou elektrochemiluminiscence (ECLIA) pro HCV protilátky a antigen rovněž prokázalo nereaktivní výsledky. Tyto nesrovnalosti mezi počátečními screeningovými testy a konfirmačními testy vyvolaly otázky týkající se specifčnosti použitých diagnostických metod. Dle anamnézy a na základě výsledků PCR lékař vyloučil možnou infekci HCV. Další vyšetřované serologické požadavky byly HIV, všechny hepatitidy včetně hepatitidy E, které vyšly nereaktivně. Pacient měl i negativní vyšetření na syfilis, kde se vyšetřovalo RPR (netreponemový test) a anti-TP (protilátky proti *Treponema pallidum*). Co se však u pacienta objevilo, byl reaktivní test na CMV IgM, což by mohlo naznačovat počáteční fázi cytomegalovirové infekce, která může interferovat s jinými serologickými testy, případně se může jednat také o nespecifickou reaktivitu (další měření pro potvrzení sérokonverze nebylo provedeno). Reaktivitu vykazovaly rovněž parametry EBV VCA IgG (Viral Capsid Antigen) EBNA IgG (Epstein-Barr Nuclear Antigen), jež znamenají prodělanou infekci EBV infekci.

V kazuistice pacienta se zaměřuji na rozporuplné výsledky testů na HCV, které ukazují na falešně reaktivní screeningové testy na HCV protilátky a antigen, při provedení měření metodou CMIA, konfirmační testy a další diagnostika metodou ECLIA naznačují, že pacient nemá aktivní infekci HCV. Tento případ poukazuje na význam konfirmačních testů v diagnostickém procesu a zdůrazňuje potřebu dalšího vyšetření v případech, kde počáteční výsledky nesouhlasí s klinickým obrazem nebo když existují pochybnosti o specifčnosti testů.

Zvláštní pozornost je věnována diferenciální diagnostice a identifikaci možných příčin falešně reaktivních výsledků, včetně potencionální zkřížené reakci, kterou nelze vyloučit ani u ostatních reaktivních parametrů. Rovněž musíme brát ohled na možné technické chyby při testování nebo vliv (interferenci) stávajícího alkoholického poškození jater.

Tato kazuistika podtrhuje důležitost komplexního přístupu k diagnostice virových hepatitid, ale i jiných infekčních onemocnění, jež se vyšetřují serologickými metodami, zejména v kontextu pacientů s existujícími jaterními onemocněními.

6 Diskuze

Při porovnání dvou různých diagnostických metod pro detekci anti-HCV a HCV antigenu, specificky se jednalo o chemiluminiscenční mikročásticovou imunoanalýzu analyzováno na přístroji Architect i2000SR a elektrochemiluminiscenční imunoanalýzu, která byla prováděna na přístroji Cobas Pure v modulu e411, nás zajímá klinická senzitivita a specifická, které určují diagnostickou správnost.

Z výsledných měření se nám potvrdila hypotéza o vyšší nespecifitě stanovení anti-HCV metodou CMIA oproti ECLIA. Tato hypotéza vycházela z obecného pozorování vyššího výskytu nespecifických reaktivit u serologických vyšetření za použití metodiky CMIA. Z celkem 16 nespecifických reaktivit stanovených metodou CMIA byl pouze 1 vzorek nespecificky reaktivní také metodou ECLIA. Výrobci uvádí specifickou 99,60 % pro CMIA a 99,94 % pro metodu ECLIA.

Nižší specifickou zapříčinily zkřížené reaktivity, kdy mohly interferovat jiné protilátky, léčba, diagnóza (stav pacienta). Mezi interferující komponenty, jak uvádí výrobce (Abbott Diagnostic, 2023), patří například přítomnost protilátek proti CMV, EBV, Treponema pallidum (při onemocnění syfilis) nebo jiné hepatitidě, vliv mohou mít dále onemocnění jako mnohočetný myelom či ALD, jak naznačuje i náš jeden případ v kazuistice (kapitola. 5.4). V našem souboru falešně reaktivních výsledků se v některých případech potvrdily i další potencionálně interferující látky, nejčastěji se jednalo o protilátky, ať už třídy IgG nebo IgM, proti CMV, EBV, SYF a HAV (hepatitida A). U značné části vzorků jsme neměli indikované dané vyšetření a neměli možnost zjistit příčinu. Výskyt falešně reaktivních výsledků stanovení anti-HCV v praxi znamená prodloužení času odezvy a navýšení finančních nákladů laboratorního vyšetření z důvodu nutnosti provedení konfirmace za využití imunoblotu.

Na základě druhé hypotézy bylo dále potvrzeno, že metoda ECLIA je méně senzitivní pro stanovení HCV Ag než CMIA. Důležité je však poznamenat, že semikvantitativní metoda HCVDUO je brána jakožto duální metoda, jejíž výsledek je interpretován jako reaktivní v případě reaktivity jakéhokoliv podvýsledku. V tomto případě metoda dosahuje srovnatelné klinické senzitivity ve smyslu zachytu onemocnění HCV (ať už protilátek anebo HCV Ag) jako CMIA. Jak uvádí výrobce, metoda je určena primárně pro screening HCV a podvýsledky anti-HCV / HCV Ag slouží jako pomůcka při výběru algoritmu konfirmačního testování reaktivních výsledků. Kombinace stanovení anti-HCV se

stanovením HCV Ag pak může představovat benefit také z důvodu zkrácení tzv. diagnostického okna, kdy jsou na počátku infekce protilátky negativní, zatímco virémie může být zachycena díky detekci HCV Ag, což popisuje například studie Husy (2019). Na OKMI jsem se během své práce s takovým případem nesešla a nemohu proto potvrdit významnost redukce diagnostického okna v praxi. Z celkového posouzení lze říci, že metoda Elecsys HCVDUO je jako duální metoda vhodná pro screening onemocnění HCV, nicméně s nižším podílem zachytu HCV Ag při aktuální infekci. Ve srovnání se standardně používaným postupem screeningu HCV – stanovením pouze anti-HCV – by tato metoda mohla najít uplatnění například při povinném vyšetřování dárců na HCV, kde by mohla přispět k eliminaci negativních výsledků testu v případě testování pacienta v období diagnostického okna.

Pokud se podíváme na srovnání analytické citlivosti obou metod v kontextu virémie stanovené pomocí PCR, tak u HCV Ag pomocí ECLIA jsme vyzorovali, že hodnoty vzorků s virémií řádově nad 10^6 IU/ml byly reaktivní, zatímco u vzorků metodou CMIA byly reaktivní již s virémií řádově 10^3 IU/ml. Přestože kvantitativní stanovení HCV Ag metodou CMIA je méně citlivé než stanovení HCV RNA pomocí PCR, můžeme potvrdit vysokou míru korelace mezi HCV Ag CMIA a PCR, tedy HCV Ag roste v závislosti na HCV RNA, vyhneme-li se vysokým hodnotám qPCR v řádech milionů, kdy už samotné kvantitativní vyjádření není v takto velkých řádech dostatečně precizní. Stanovení HCV Ag by v tomto případě mohlo dobře sloužit jako finančně efektivnější varianta pro sledování průběhu léčby do doby dosažení detekčního limitu, kdy eradikace viru by musela být následně potvrzena pomocí PCR, nicméně národní doporučení pro diagnostiku a monitorování terapie HCV (2021) se odkazují na detekci HCV RNA v jednotkách IU/ml a stanovení HCV Ag je považováno primárně jako doplňující test ke stanovení anti-HCV při screeningu HCV.

Vzhledem k tomu, že se jednalo o dva různé analytické systémy od různých firem, ráda bych zhodnotila také aspekty z hlediska uživatelské přiznivosti. Architect i2000SR má z mého pohledu přehlednější uživatelské rozhraní, například obsluha ocenění český překlad. Cobas Pure má jednodušší denní údržbu, kterou dělá bez nutnosti obsluhy, kdežto Architect i2000SR potřebuje dodávat a připravovat roztoky uživatelem. Cobas Pure dále disponuje předřazovacím místem pro statimové vzorky a lepší manipulací s reagensy. Systém kalibrací a měření kontrolního materiálu je u obou systému srovnatelný.

Na OKMI FN Brno využíváme stanovení HCV Ag jako reflexní test při reaktivitě anti-HCV. Výhodou je, že v případě reaktivity HCV Ag je klinik zároveň s výsledkem anti-HCV upozorněn na probíhající infekci HCV (na přítomnost anti-HCV s virémií) a anti-HCV nejsou dále potvrzovány finančně nákladným a metodicky zdlouhavým imunoblotem. Použití HCV Ag (CMIA) od firmy Abbott tak vzhledem k vyšší citlivosti vede v tomto případě k vyšší výtěžnosti než použití HCV Duo. HCV Duo zase představuje specifitější metodu stanovení anti-HCV a poměrně významně snižuje počet prováděných konfirmačních testů imunoblotem.

7 Závěr

Hepatitis C je závažným onemocněním, které může vést k chronickému jaternímu poškození. V kontextu včasného zjištění a efektivní strategie léčby se stává pečlivá laboratorní diagnostika nezbytnou.

Tato bakalářská práce byla strukturována tak, že nejdříve byla představena teoretická část zaměřená na důkladný přehled virologie a diagnostiky hepatitidy C, následovaná praktickým vyhodnocením detekce HCV a protilátek proti HCV u náhodně vybraných a specificky selektovaných vzorků séra a plazmy.

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo provést srovnávací analýzu dvou diagnostických metod pro detekci anti-HCV a HCV antigenu. Analýza se zaměřila na hodnocení a porovnání jejich diagnostické správnosti na základě výsledků kvantitativní PCR a specifického WB, s cílem identifikovat optimální diagnostickou metodu v závislosti na specifických potřebách ÚLM-OKMI.

Studie v této práci potvrdila, že zatímco metoda HCV Ag CMIA poskytuje vyšší senzitivitu pro detekci nižších hladin virémie, HCVDUO ECLIA se vyznačuje větší specificitou a menším počtem zkřížených reaktivit. Diskuze v práci dále zdůrazňuje, že obě metody mají své výhody a omezení, které je třeba zvážit při výběru nejvhodnějšího testu pro diagnostiku HCV v klinické praxi s přihlédnutím na to, že pracoviště ÚLM-OKMI se nezaměřuje pouze na screeningová a kvalitativní vyšetření, ale i na specializované vyšetření potřebné k monitorování léčby čili kvantitativní stanovení virémie. V současné praxi je ovšem stanovení HCV Ag využíváno zejména jako reflexní testování při prvním záchytu anti-HCV, tedy v rámci screeningu HCV. Indikace k tomuto vyšetření ze strany kliniků je v současné době minimální. Při konečném výběru metody tedy bude přihlédnuto také k možnostem přístrojového vybavení či k laboratornímu workflow než pouze k zjištěným analytickým vlastnostem testovaných metodik.

8 Seznam použitých zdrojů

1. Abbott Diagnostics. (2023a). *HCV Ag*.
2. Abbott Diagnostics. (2023b). *Anti-HCV*.
3. Abdel-Hakeem, M. S., & Shoukry, N. H. (2014). Protective Immunity Against Hepatitis C: Many Shades of Gray. *Frontiers in Immunology*, 5, 1-4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00274>
4. Alter, M. J. (2007). Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World Journal of Gastroenterology*, 13(17). <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i17.2436>
5. *ARCHITECT A-HCV(500T)*. (c2024). Abbott. Retrieved April 21, 2024, from <https://www.e-abbott.com/architect-a-hcv-500t.html>
6. Assays employing electrochemiluminescent labels and electrochemiluminescence quenchers. <https://patentimages.storage.googleapis.com/e9/32/fe/f33f992e559bbb/US7314711.pdf>
7. BioLAB s.r.o.: NEXTCLINICS Czech a.s. (2024). *Laboratorní manuál pro lékaře: Přehled laboratorních metodik*. (F. Musil), NextLab.cz. Retrieved March 21, 2024, from <https://www.nextlab.cz/biolabkt-laboratorni-metodiky/HVEZDAAAYR.htm>
8. Boulestin, A., Sandres-Sauné, K., Payen, J. -L., Alric, L., Dubois, M., Pasquier, C., Vinel, J. -P., Pascal, J. -P., Puel, J., & Izopet, J. (2002). Genetic heterogeneity of the envelope 2 gene and eradication of hepatitis C virus after a second course of interferon- α . *Journal of Medical Virology*, 68(2), 221-228. <https://doi.org/10.1002/jmv.10192>
9. Bunz, M., Ritter, M., & Schindler, M. (2022). HCV egress – unconventional secretion of assembled viral particles. *Trends in Microbiology*, 30(4), 364-378. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.08.005>
10. Datový standard pro předávání dat mezi informačními systémy zdravotnických zařízení [DASTA]. (c2020). *Metrologická terminologie*. DASTA. Retrieved April 21, 2024, from <https://www.dastacr.cz/dasta/hypertext/MZAZT.htm>
11. Forster, R. J., Bertoncello, P., & Keyes, T. E. (2009). Electrogenerated chemiluminescence. *Annual review of analytical chemistry (Palo Alto, Calif.)*, 2, 359–385. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-060908-155305>

12. Hejda, V. (2016). Chronická virová hepatitida typu C – komplexní klinický přehled. *Medical Tribune*, 2016, 3-25. <https://www.tribune.cz/archiv/chronicka-virova-hepatitida-typu-c-komplexni-klinicky-prehled/>
13. *Hepatitis C antibodies: Hepatitis C.* (c2024). The doctors laboratory. Retrieved April 21, 2024, from <https://www.tdlpathology.com/specialties/virology/hepatitis-testing/hepatitis-c-antibodies-information/>
14. Husa, P. (2005). *Virové hepatitidy*. Galén.
15. Husa, P. (2019). Current pharmacotherapy of viral hepatitis. *Klinická farmakologie a farmacie*, 33(1), 32-37. <https://doi.org/10.36290/far.2019.005>
16. Klinické doporučené postupy Ústavu zdravotnických informací a statistiky (2021). *Časná diagnostika a léčba chronické virové hepatitidy C*. <https://kdp.uzis.cz/res/guideline/25-casna-diagnostika-lecba-chronicke-virove-hepatitidy-c-vhc-final.pdf>
17. Krajská hygienická stanice Středočeského kraje [KHSSTC]. (2023). 28. července si připomínáme světový den hepatitidy. Krajská hygienická stanice Středočeského kraje. Retrieved April 21, 2024, from <https://khsstc.cz/28-cervence-si-pripominame-svetovy-den-hepatitidy/>
18. Majchrzak, M., Bronner, K., Laperche, S., Riester, E., Bakker, E., Bollhagen, R., ... & Schmidt, M. (2022). Multicenter performance evaluation of the Elecsys HCV Duo immunoassay. *Journal of clinical virology*, 156, 105293.
19. Mikrogen Diagnostic. (2023). *RecomLine HCV IgG*. Retrieved March 21, 2024, from <https://www.mikrogen.de/produkte-automation/produktfinder/recomline-hcv-igg>
20. Morozov, V. A., & Lagaye, S. (2018). Hepatitis C virus: Morphogenesis, infection and therapy. *World Journal of Hepatology*, 10(2), 186-212. <https://doi.org/10.4254/wjh.v10.i2.186>
21. Pawlotsky, J. -M., Negro, F., Aghemo, A., Berenguer, M., Dalgard, O., Dusheiko, G., Marra, F., Puoti, M., & Wedemeyer, H. (2020). EASL recommendations on treatment of hepatitis C: Final update of the series☆. *Journal of Hepatology*, 73(5), 1170-1218. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.08.018>

22. Plzák, Z. (Ed). (c2003-2024). *Metrologická terminologie* (Verze 3.01). SEKK s.r.o. & EURACHEM-ČR. <https://www.sekk.cz/terminologie/index.php?akce=terminologie>
23. Roche diagnostic. (2022). *Elecsys® HCV Duo Immunoassay for the qualitative dual detection of HCV core antigen and antibodies to HCV*. Roche diagnostic. Retrieved April 21, 2024, from <https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/elecsys-hcv-duo.html&ved=2ahUKEwiTqYz4jNSFAxWLywIHHRUHDq8QFnoECBwQAQ&usg=AOvVaw0G8I1xs4kts2CKPqrhzfRq>
24. Roche Diagnostics. (2023). *Elecsys® HCV Duo*.
25. Seng-Lai, T. (Ed.). (2006). *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*. Horizon Bioscience.
26. Trendy v Hepatologii. (2010). https://trendyvhepatologii.sk/wp-content/uploads/2020/10/Trendy-HEPA-02-2010_sec.pdf
27. U.S. Department of Veterans Affairs (VA). (2018). *Viral Hepatitis and Liver Disease*. U.S. Department of Veterans Affairs. Retrieved April 21, 2024, from <https://www.hepatitis.va.gov/hcv/background/genotypes.asp>
28. Urbánek, P. (2019). Virová hepatitida typu C. *Medical Tribune, 2019*, 21. <https://www.tribune.cz/archiv/virova-hepatitida-typu-c/>
29. Urbánek, P., Fraňková, S., Husa, P., Šperl, J., Plíšek, S., Rožnovský, L., & Kümpel, P. (2019). *Standardní diagnostický a terapeutický postup chronické infekce virem hepatitidy C (HCV)*. Česká hepatologická společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně. Retrieved March 21, 2024, from <https://www.ces-hep.cz/file/595/2018-guidelines-hcv-chssil-1.pdf>
30. Urbánek, P., Husa, P., Šperl, J., Fraňková, S., Plíšek, S., Rožnovský, L., & Kümpel, P. (2017). Clinical practice guidelines for chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterologie a hepatologie, 71*(2), 117-136. <https://doi.org/10.14735/amgh2017117>
31. Vyhláška o lidské krvi, č. 143/2008 Sb. (2008). *Zákony pro lidi.cz*. AION CS., from: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2008-143>

32. Wahaab, A., Mustafa, B. E., Hameed, M., Stevenson, N. J., Anwar, M. N., Liu, K., Wei, J., Qiu, Y., & Ma, Z. (2022). Potential Role of Flavivirus NS2B-NS3 Proteases in Viral Pathogenesis and Anti-flavivirus Drug Discovery Employing Animal Cells and Models: A Review. *Viruses*, *14*(1), 1-16. <https://doi.org/10.3390/v14010044>
33. World Health Organization (WHO). (2024). *Hepatitis C*. Retrieved April 21, 2024, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>
34. Zaltron, S., Spinetti, A., Biasi, L., Baiguera, C., & Castelli, F. (2012). Chronic HCV infection: epidemiological and clinical relevance. *BMC Infectious Diseases*, *12*(S2). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-S2-S2>

9 seznam obrázků

| | |
|--|----|
| Obrázek 1 Virus hepatitidy C (Zdroj: Morozov & Lagaye, 2018) | 11 |
| Obrázek 2 Genom HCV (Zdroj: Abdel-Hakeem & Shoukry, 2014)..... | 12 |
| Obrázek 3 Vstup a replikace viru v hepatocytu (Zdroj: Bunz et al., 2022)..... | 14 |
| Obrázek 4 Kinetika markerů od expozice viru (Zdroj: Hepatitis C antibodies: Hepatitis C, c2024) | 17 |
| Obrázek 5 schéma screeningu HCV (Zdroj: vlastní)..... | 19 |
| Obrázek 6 průběh reakce a výsledný testovací strip s pozitivní reakcí (Zdroj: Mikrogen Diagnostic, 2023)..... | 22 |
| Obrázek 7 Obecné schéma qRT-PCR (Zdroj: Vlastní) | 23 |
| Obrázek 8 Architect i2000 _{SR} na OKMI FN Brno (Zdroj: Vlastní)..... | 28 |
| Obrázek 9 Reagenční Kit Anti-HCV na 500 testů (Zdroj: ARCHITECT A-HCV(500T), c2024) | 30 |
| Obrázek 10 Stojan se vzorky – vložení vzorků do analyzátoru Architect i2000 _{SR} (Zdroj: Vlastní) | 32 |
| Obrázek 11 Cobas Pure na OKMI FN Brno (Zdroj: vlastní)..... | 35 |
| Obrázek 12 Schéma reakce – nahoře HCV Ag dole AHCV (Zdroj: Roche diagnostic, 2022)..... | 37 |
| Obrázek 13 Vkládání vzorků do Cobas Pure (Zdroj: vlastní) | 38 |

9.1 Seznam grafů

| | |
|---|----|
| Graf 1 Korelace mezi HCV Ag a HCV RNA (Zdroj: Vlastní)..... | 48 |
| Graf 2 Korelace nižších hodnot HCV Ag a HCV RNA (Zdroj: Vlastní)..... | 49 |

9.2 Seznam tabulek

| | |
|---|----|
| Tabulka 1 Varianty výsledků stanovení protilátek proti hepatitidě C | 41 |
| Tabulka 2 Zastoupení správně pozitivních vzorků na anti-HCV | 43 |
| Tabulka 3 Zastoupení správně negativních vzorků na anti-HCV..... | 44 |
| Tabulka 4 Varianty výsledků u vyšetření HCV Antigenu..... | 45 |
| Tabulka 5 Zastoupení správně pozitivních vzorků na HCV Ag..... | 46 |
| Tabulka 6 Zastoupení správně negativních vzorků na HCV Ag | 47 |

10 Seznam zkratek

HCV – Hepatitis C Virus

Anti-HCV – Protilátky proti hepatitidě C

HCV Ag – Antigen hepatitidy C

CMIA – Chemiluminiscenční mikročasticová imunoanalýza

ECLIA – Elektrochemiluminiscenční imunoanalýza

PCR – Polymerase Chain Reaction

RNA – Ribonukleová kyselina

WB – Western Blot

IgG – Imunoglobulin G

IgM – Imunoglobulin M

ALT – Alaninaminotransferáza

CLIA – Chemiluminiscenční imunoanalýza

qPCR – Kvantitativní Polymerase Chain Reaction

RLU – Relativní světelné jednotky

S/CO – Signal to Cut Off

HCC – Hepatocelulární karcinom

LaIS – Laboratorní informační systém

SVR – Trvalá virologická odpověď

SR-BI – Scavenger Receptor třídy B typu I

CLDN1 – Claudin 1

OCLN – Occludin

DC-SIGN – Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin

L-SIGN – Liver/lymph node-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin

SYF – Syphilis

EBV – *Epstein-Barr Virus*

CMV – *Cytomegalovirus*

ALD – Alkoholické onemocnění jater

ER – Endoplazmatické retikulum

TP – *Treponema pallidum*

anti-TP – Protilátky proti *Treponema pallidum*

WHO – Světová zdravotnická organizace