

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2013

Zuzana Skrášková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Význam určování genotypů viru hepatitidy C

Bakalářská práce

Zuzana Skrášková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013

Vedoucí práce: Ing. Dalibor Novotný, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci zpracovala samostatně pod vedením Ing. Dalibora Novotného, Ph.D. a že jsem v seznamu literatury uvedla všechny zdroje, jež byly při zpracování bakalářské práce použity.

V Olomouci dne 23. 4. 2013

.....
Zuzana Skrášková

Souhrn

Hepatitida typu C patří mezi závažná onemocnění a její výskyt je vázaný na socioekonomickou úroveň populace. Onemocnění je způsobeno virem hepatitidy C, který se řadí do čeledi *Flaviviridae*. Virová hepatitida typu C se rozvíjí velice pomalu (až několik desítek let) a v konečném důsledku postihuje játra. I když je toto onemocnění v mnoha ohledech omezující, nemusí být vždy příčinou smrti.

Práce se v teoretické části zaměřuje na literární přehled dosavadních poznatků týkajících se bezprostředně viru hepatitidy C, tedy jeho systematického zařazení, morfologie, epidemiologie, patogeneze, laboratorní diagnostiky a podobně. V praktické části se pak práce zabývá ověřením metody, která je běžně používána v klinické praxi pro stanovování genotypů viru hepatitidy C. Jedná se o použití metod, jako jsou polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí a reverzní hybridizace. Závěr práce je věnován významu určování genotypů viru hepatitidy C, jenž spočívá především v rozdílnosti reakcí jednotlivých genotypů na současnou léčbu.

Summary

Hepatitis type C is considered to be one of the serious diseases and its rate depends on the socio-economic level of population. This disease is caused by hepatitis C virus which is currently classified as a member of *Flaviviridae* family. Viral hepatitis C is characterized by slow progress (which can persist for more than decades) and in the end it affects the liver. Even though this disease is limiting for patients in many ways, it does not have to be mortal.

In theoretical part, this thesis is focused on a review dealing with existing knowledge related to viral hepatitis C such as classification, morphology, epidemiology, pathogenesis, laboratory diagnostics and so on. The experimental part of this thesis is focused on verification of the method commonly used for genotyping of hepatitis C virus in clinical practice. These methods include reverse transcriptase-polymerase chain reaction and reverse hybridization. The last part of the thesis concerns the importance of hepatitis C virus genotyping which is valuable mostly because of different responses to treatment between particular genotypes.

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu své bakalářské práce Ing. Daliboru Novotnému, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, čas a poskytnutí zázemí v laboratoři, stejně tak děkuji jemu a všem zaměstnancům Laboratoře molekulární biologie, Oddělení klinické biochemie FN Olomouc za vstřícný přístup a odborné rady. Dále děkuji svým rodičům za umožnění bakalářského studia a svému příteli za poskytnutí nesmírné psychické podpory.

Obsah

1 ÚVOD.....	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Systematické zařazení HCV	11
2.2 Morfologie	11
2.3 Virový genom, genotypy HCV	14
2.3.1 Identifikace genotypů.....	16
2.4 Životní cyklus HCV	19
2.5 Epidemiologie.....	20
2.5.1 Epidemiologie v ČR.....	21
2.6 Patogeneze	22
2.6.1 Mechanismy perzistence HCV	23
2.6.2 Heterogenita HCV	24
2.7 Klinický obraz onemocnění.....	25
2.7.1 Akutní infekce HCV	25
2.7.2 Chronická infekce HCV	26
2.8 Laboratorní diagnostika.....	26
2.8.1 Sérologické detekční metody	27
2.8.2 Molekulární biologie a hepatitida C	27
3 PRAKTICKÁ ČÁST	29
3.1 Cíl práce.....	30
3.2 Materiál a metodika	31
3.2.1 Přístroje a pomůcky.....	31
3.2.2 Chemikálie	32
3.2.3 Izolace HCV RNA	35
3.2.4 PCR a RT-PCR	36
3.2.5 Reverzní hybridizace.....	39
3.3 Výsledky.....	41
3.4 Diskuze	45
4 ZÁVĚR.....	46

5 SEZNAM LITERATURY.....	47
5.1 Seznam hypertextových odkazů	52
6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	53

1 ÚVOD

Hepatitis je zánětlivé onemocnění jater, které je ve většině případů způsobeno virovou infekcí. V současné době se rozlišuje pět hlavních typů virů způsobujících hepatitidu, jedná se o typy označované jako A, B, C, D a E. Tyto typy hepatitid jsou brány nejvíce v úvahu, a to především kvůli jejich epidemickému šíření a možnosti způsobit až smrt. Konkrétně typ C může po čase dospět do chronického stádia infekce, kterým trpí celosvětově stovky milionů lidí a zároveň je také nejčastější příčinou jaterní cirhózy a rakoviny.

Hepatitis C je obvykle výsledkem parenterálního kontaktu jedince s infikovanými tělními tekutinami. Mezi běžné způsoby přenosu se pak řadí přijetí kontaminované krve nebo jiného krevního produktu pacientem, i když toto riziko je v současné době zásadně omezováno důkladným testováním krve dárců. Dále je přenos možný v průběhu invazivního lékařského zásahu za použití kontaminovaných nástrojů nebo injekčních jehel, nevylučuje se ani přenos z matky na dítě nebo při sexuálním kontaktu. Nejvíce rizikovou skupinou jsou intravenózní uživatelé drog.

Akutní infekce může mít jen omezené a nebo žádné příznaky, v opačném případě se projevuje zežloutnutím kůže a očního bělma, tmavou močí, extrémní únavou, zvracením a bolestmi břicha.

Inkubační doba hepatitidy C se pohybuje od dvou týdnů do šesti měsíců. Po ní následuje iniciační infekce, v průběhu které většina pacientů nevykazuje žádné příznaky. U přibližně 75-85 % nově infikovaných osob se rozvine infekce chronická a 60-70 % z nich pak trpí chronickým onemocněním jater. U 5-20 % jedinců dochází ke vzniku cirhózy a nakonec 1-5 % z těchto osob v důsledku cirhózy či rakoviny jater umírá (www.who.int).

Diagnostika akutní infekce není ve většině případů možná, a to právě kvůli nedostatečnému projevu symptomů. Běžnými metodami k detekci protilátek, jako je například enzymová imunoanalýza, není možné odlišit akutní infekci od chronické, protože přítomnost protilátek značí, že daná osoba byla či stále ještě je infikována. Z toho důvodu se pro zjištění infekce používají molekulární metody jako přímá detekce ribonukleové kyseliny viru.

Hepatitis typu C nevyžaduje ve všech případech léčbu antivirotiky. V současné době je rozeznáváno šest základních genotypů viru hepatitidy C a odpověď každého z nich na léčbu je odlišná. Genotypizace viru je tedy nutná před zahájením léčby samotné, aby mohl být

pacientovi poskytnut nejvhodnější přístup. Proti hepatitidě typu C dosud není možné se očkovat.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Systematické zařazení HCV

Ke klasifikaci virů se využívá několika hledisek. Patří mezi ně typ nukleové kyseliny (DNA nebo RNA), počet vláken nukleových kyselin a jejich konstrukce (jednovláknová, dvouvláknová, lineární, cirkulární), polarita virového genomu, symetrie nukleokapsidu, přítomnost - nebo nepřítomnost lipidového obalu. Na základě těchto kritérií jsou viry tříděny do kmenů, čeledí a rodů. Virus hepatitidy C patří do kmene RNA virů, čeledi *Flaviviridae*, rod *Hepacivirus* (Collier a Oxford, 2000). Společně s několika dalšími viry podobného typu, jako jsou například viry označované GB-A, GB-B a GB-C (mají podobné vlastnosti, ovšem jsou antigenně a geneticky odlišné), je virus hepatitidy C řazen do čeledi *Flaviviridae*. Zde se řadí také rody *Flavivirus* či *Pestivirus* (Fraňková, 1996).

2.2 Morfologie

Čeď *Flaviviridae* se vyznačuje sférickými částicemi o velikosti 55-65 nm. Na jejich povrchu se nachází lipidová membrána s krátkými glykoproteinovými výběžky, obalovými proteiny. Protein kapsidy má v průměru 33-40 nm a vyznačuje se ikosahedrickou symetrií, přičemž délka jedné strany hexagonu je přibližně 20 nm. (Kaito a kol., 2006)

Mezi strukturální proteiny HCV se řadí virový kapsidový protein. Jedná se o bazický protein, který spolu s nukleovou kyselinou vytváří nukleokapsid. Kapsidový protein je tvořen prvními 191 aminokyselinami a lze jej rozdělit do tří domén na základě jejich hydrofobity. Doména 1 (složená z aminokyselin 1-117) obsahuje hlavně bazické zbytky se dvěma krátkými hydrofobními oblastmi. Doména 2, která je tvořena aminokyselinami 118-174, je méně bazická a více hydrofobní. Doména 3, složená z aminokyselin 175-191, je vysoce hydrofobní a vystupuje také jako signální sekvence pro obalový protein E1 (Bukh a kol., 1994). Kapsidový protein může vázat virovou RNA pomocí domény 1 a jejích aminokyselin 1-74. Kapsida je cytozolický na membráně vázaný protein, který je asociován s endoplazmatickým retikulem, lipidovými shluky, mitochondriemi a nukleovou kyselinou. Protein kapsidy může být také přímo či nepřímo zahrnut v hepatokarcinogenezi (Hope a kol., 2002; Lerat a kol., 2002).

Další složkou strukturálních proteinů jsou obalové glykoproteiny (tvoří glykoproteinové výběžky virionu). Glykoprotein E má schopnost vázat se na buněčné

receptory a působí jako hemagglutinin. Membránový protein se vyskytuje pouze na zralých extracelulárních virionech, jinak je přítomen uvnitř buňky jako glykosylovaný prekurzor (prM). Na viru HCV se nachází dva takové glykoproteiny a jsou označovány jako E1 a E2. Oba z těchto proteinů jsou vysoce glykosylovány a hrají důležitou roli při vstupu virové částice do hostitelské buňky. Obalový glykoprotein E1 obsahuje čtyři nebo pět glykanů vázaných přes dusík a naproti tomu protein E2 obsahuje 11 vazebných N-glykosylovaných míst, ovšem počty těchto míst závisí na virovém genotypu. Tato místa na obou proteinech E1 i E2 jsou velice konzervativní a v jejich oblasti se vyskytuje vysoké množství manózových postranních řetězců. HCV glykany hrají podstatnou roli při skládání obalových glykoproteinů a při receptorových interakcích viru (Goffard a kol., 2009). Obalové proteiny zřejmě umožňují vstup do buňky, a to rozpoznáním buněčných membránových receptorů (Bartosch a kol., 2003). Oblast E2 obsahuje navíc dvě hypervariabilní oblasti (HVR1 a HVR2), ve kterých dochází k častým mutacím a to proto, že jsou pod neustálým selekčním tlakem neutralizačních protilátek (Boulestin a kol., 2002; Polyak a kol., 1998).

Mezi strukturální proteiny se řadí i protein p7. Jedná se o polypeptidovou sekvenci 63 aminokyselin a je lokalizovaná mezi oblastmi genu kódující proteiny E2 a NS2. Je to protein vázaný na membránu endoplazmatického retikula (ER) hostitelské buňky a jeho sestřih je zprostředkován signálními peptidázami ER. Dvě transmembránové domény (TMD) jsou propojeny cytoplazmatickou smyčkou a orientovány naproti lumenu ER. Bylo také dokázáno, že karboxylovaný konec TMD proteinu p7 může fungovat jako signální sekvence, která spouští translokaci NS2 do lumenu ER, kde dochází k příslušnému sestřihu za účasti signálních peptidáz hostitelské buňky. Proteiny p7 formují v buňce iontové kanály, které hrají základní roli při virové infekci (Griffin a kol., 2003). Protein p7 má tedy charakteristiky podobné skupině proteinů zvané viroporiny a je taktéž nezbytný pro skládání virových částic a uvolnění infekčních virionů (Steinman a kol., 2007).

Dalšími proteiny, jež jsou kódovány virovým genomem, jsou proteiny nestrukturální. Protein NS2 je transmembránový a má velikost 21-23 kDa. Je nezbytný pro dokončení replikačního cyklu viru (Pietschmann a kol., 2006). NS2 obsahuje vysoce hydrofobní zbytky na N-koncích a ty formují tři nebo čtyři transmembránové šroubovice, které jsou pak vkládány do membrány ER. Část proteinu NS2 na svém C-konci je v cytoplazmě (spolu s N-koncovou doménou NS3) důležitá pro autoproteázovou aktivitu komplexu NS2/3 (Grakoui a kol., 1993). Proteiny NS2 a NS3 byly označeny jako metaloproteázy, a to na základě výzkumů, kdy bylo zjištěno, že exogenní zinek je schopen stimulovat proteázovou

aktivitu a na druhou stranu chelatační činidla, jako například EDTA (etylendiamin tetraoctová kyselina), jejich proteázovou aktivitu inhibovala. Zinek, jako esenciální prvek, může stabilizovat strukturu aktivního místa NS3 (Reed a kol., 1995).

V případě NS3 se jedná o protein o velikosti 67 kDa a jeho aktivita může být různorodá. N-konec NS3 se vyznačuje serin proteázovou aktivitou a C-konec má NTPázovou/helikázovou aktivitu (Gallinari a kol., 1998). NS3 protein se váže na membránu ER spolu s proteinem NS4A (Wolk a kol., 2000). Protein NS3 zahrnuje taktéž krátkou sekvenci, která interaguje s katalytickou podjednotkou proteinkinázy A (PKA). Tato interakce pak vede k zadržení katalytické podjednotky PKA v cytoplazmě, čímž se zabrání jejímu vstupu do jádra. PKA modifikuje intracelulární proteiny navázáním fosfátové skupiny a tím dojde ke změně funkce daného cílového proteinu. Z toho důvodu může interakce NS3 s PKA deregulovat vnitrobuněčnou signalizaci (Borowski a kol., 1997). Enzymatická NTPázová/helikázová aktivita NS3 je nepostradatelná pro replikaci HCV RNA. Mezi předpokládané funkce NS3 během replikace patří například rozvinutí dvouvláknových RNA meziproduktů, eliminace vzniku sekundárních RNA struktur nebo oddělení vlastního genomu od proteinů vázajících nukleovou kyselinu (Serebov a Pyle, 2004; Levin a kol., 2005).

NS4A je protein o délce 54 aminokyselin, který vystupuje jako kofaktor proteinu NS3. Tento protein má vysoce hydrofobní N-konec a studie prokázaly, že je zahrnut v procesu cílení NS3 do membrány ER (Wolk a kol., 2000). Usuzuje se, že posledních dvacet aminokyselin vytváří transmembránovou šroubovici, která pak upevňuje komplex NS3/NS4A v membráně ER. Tato interakce umožňuje činnost aktivačního místa NS3 a také více efektivní sestřih proteázami (Kim a kol., 1996). Přítomnost NS4A je rovněž požadována pro fosforylaci NS5A a s tímto proteinem může i přímo interagovat (Asabe a kol., 1997).

Malý, hydrofobní protein NS4B o velikosti 27 kDa má důležitou roli při přijímání jiných virových proteinů buňkou. Obsahuje čtyři transmembránové domény. Cytoplazmatický C-konec NS4B a N-konec mohou mít dvojí umístění, kde většina struktury čelí lumenu ER (Lundin a kol., 2006).

Oproti tomu NS5A je hydrofilní fosfoprotein, který se účastní virové replikace, modifikuje buněčné signální dráhy a odpověď na interferon (Macdonald a kol., 2004; Reed a kol., 1997). NS5A neobsahuje žádnou transmembránovou doménu. Asociace NS5A s membránou je tedy zprostředkována pomocí unikátního amfipatického alfa helixu, lokalizovaném na jeho N-konci (Brass a kol., 2002; Penin a kol., 2004). Mutace tohoto helixu narušuje asociaci s membránou a brání tak tvorbě buněk, ve kterých by mohly vznikat virové

replikony (Elazar a kol., 2003). Předpokládá se, že protein NS5A interaguje s četnými proteiny ovlivňujícími buněčnou signalizaci. NS5A může regulovat tři základní MAPK (mitogenem aktivované proteinkinázové) dráhy zahrnuté v mitogenní signalizaci hostitelské buňky, které regulují například růst. NS5A je schopen regulace buněk jak proapoptickými tak protiapoptickými mechanismy (Macdonald a kol., 2004).

NS5B je protein o velikosti 65 kDa a vystupuje jako RNA dependentní RNA polymeráza. Hraje tedy roli při syntéze nového RNA genomu viru (Bahrens a kol., 1996). Proces replikace probíhá přes syntézu komplementární záporně nabitě RNA za použití genomu jako templátu, následuje syntéza genomické kladné RNA z předchozího záporného meziprojektu. Jelikož je protein NS5B hlavní složkou virové replikace, je také předním cílem antivirových zásahů (De Francesco a Migliaccio, 2005).

2.3 Virový genom, genotypy HCV

Genom má povahu RNA s pozitivní polaritou, je nesegmentovaný a obsahuje 9379 nukleotidů. Jeho relativní molekulární hmotnost je 4×10^6 . Struktura genomu a jeho základní charakteristiky odpovídají z velké části charakteristikám čeledi *Flaviviridae*. Genom viru hepatitidy C je tvořen kladnou jednovláknovou RNA o velikosti 9,6 kb. RNA obsahuje nepřekládané sekvence na 5' a 3' koncích a 3' konec není polyadenylován. V genomu jsou také obsaženy tzv. UTR oblasti (nepřekládané sekvence; Untranslated Regions), které jsou nezbytné pro virovou translaci a replikaci. Pořadí kódovaných proteinů od 5' k 3' konci je C, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A a NS5B, jak je uvedeno na obrázku 1 (Obr. 1). Virový genom vystupuje zároveň jako mRNA a má pouze jediný otevřený čtecí rámeček (Collier a Oxford, 2006). Virová RNA kóduje pouze jeden gen o velikosti 9600 bází, na jehož základě je exprimován polyproteinový prekurzor, jenž je tvořen přibližně 3010 aminokyselinami (Urbánek a Husa, 2010). Mezi strukturální proteiny patří protein kapsidy C a dva obalové proteiny E1 a E2, které jsou významné z důvodu přítomnosti antigenních epitopů. Ty se uplatňují při neutralizaci viru protilátkou. V oblasti genu kódující E2 protein se navíc nachází hypervariabilní oblast se schopností rychle mutovat (pod vlivem protilátek), což usnadňuje virovou perzistenci. Ke své replikaci potřebuje HCV nestrukturální proteiny (NS2, NS3, NS4, NS5), patří mezi ně především virová proteáza, helikáza a RNA-dependentní RNA polymeráza (Votava, 2003).

Standardní systém pro klasifikaci HCV je důležitý zejména z hlediska studia epidemiologie, evoluce a patogeneze. Speciální význam se klasifikaci přikládá hlavně v klinické praxi, jelikož odpověď organismu na kombinovanou léčbu interferonem- α a ribavirinem závisí právě na typu genotypu HCV. Klasifikační systém tedy musí být solidní, založený na objektivních kritériích a musí být schopen přizpůsobení se nově objevovaným genetickým variantám a rekombinantním formám HCV. Aby mohly být splněny tyto požadavky, klasifikační systém (stejně jako jiné biologické systémy) musí být založen na evoluční příbuznosti jednotlivých druhů (Simmonds a kol., 2005).

Když byl v devadesátých letech dvacátého století objeven rozsah genetické heterogenity HCV, prudce vzrostl počet metod, které se začaly používat k jejich klasifikaci. Každá z těchto metod se pak lišila popisem jednotlivých genotypů. Vždy však byly rozlišovány dvě úrovně genetické variability a těm byla následně pro rozlišení postupně přiřazována čísla (genotypy) a malá písmena (subtypy). Genotypy se pak označují jako HCV 1a, 2b, a podobně. Pro vyřešení těchto nejasností v klasifikaci HCV byl navrhnout klasifikační systém založený na fylogenetických metodách. Tento systém pak člení typy HCV do šesti genetických skupin. Na obrázku 2 (Obr. 2) je zobrazen evoluční strom genotypů v závislosti na jejich výskytu v jednotlivých oblastech světa (Simmonds a kol., 2005). Tyto přibližně stejně vzdálené genetické skupiny obsahují každá různé množství blíže souvisejících (geneticky a epidemiologicky) subtypů. Genotypy se liší jeden od druhého na nukleotidové úrovni o 31-33 %, pro členění do subtypů je nutná odlišnost v dalších 20-25 % nukleotidů. Navzdory sekvenční diverzitě HCV, všechny genotypy sdílejí v otevřeném čtecím rámci identický komplement ko-lineárních genů o podobné (nebo stejné) velikosti (Robertson a kol., 1998). Tato zjištění umožnila provizorní zařazení mnoha doposud známých variant HCV na základě parciálních sekvencí ze subgenomických oblastí jako například core/E1 nebo NS5B (Simmonds a kol., 1994). Nejvíce konzervativní oblastí genomu je 5'UTR a 99 koncových bází na 3'UTR. Odvozená aminokyselinová sekvence kapsidového proteinu je v rámci genotypů také poměrně stálá. Nejvíce variabilní oblastí genomu HCV je pak hypervariabilní oblast (HVR), nacházející se v oblasti genu pro E2 protein (Weiner a kol., 1991).

Výše zmíněné genotypy 1 až 6 se vyskytují v rozdílných geografických lokalitách. Genotypy 1, 2 a 3 jsou příčinou infekcí v západní Evropě a v Severní Americe, genotyp 4 je běžný v severní a střední Africe a na Středním Východě, genotyp 5 se vyskytuje v jižní Africe a nakonec genotyp 6 je rozšířen v jihovýchodní Asii. Geografické odlišnosti je možno

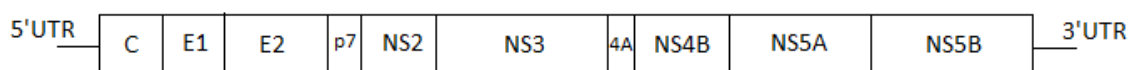
pozorovat i mezi jednotlivými subtypy HCV. Bylo také zjištěno, že existuje závislost závažnosti onemocnění na typu genotypu viru hepatitidy C (Stránský, 1999).

I když primární rozdělení variant HCV do šesti základních genetických skupin je evidentní z fylogenetických analýz, byla rozpoznána větší genetická diverzita mezi skupinami 2, 3 a 6. Dodatečně byla tedy navržena klasifikace skupin 3 a 6 jako hlavních separovaných genotypů HCV. Tyto genetické skupiny byly přejmenovány na klady. Do kladu 6 byly zahrnuty genotypy 6, 7, 8, 9 a 11; obdobně klad 3 obsahoval varianty klasifikované jako genotypy 3 a 10. Tím pádem došlo k rozdělení pojmů genetická skupina a genotypy, které dříve označovaly totéž (Robertson a kol., 1998; Tokita a kol., 1994). Vynucení další úrovně variability vedlo k rozhodnutí o rozsáhlých klasifikačních změnách, které ohrožovaly jednoduchost původního systému. Kromě obtíží s odlišením hranice mezi genotypy a klady, byla výsledná klasifikační hierarchie rozporuplná. V některých případech obsahoval klad pouze jeden genotyp a tyto pojmy pak mohly být zaměnitelné, jiné klady mohly naopak obsahovat i pět a více genotypů. Všechny výše zmíněné důvody vedly k tomu, že se klady a genotypy označovaly v rozdílných publikacích různě. Byly tedy ustanoveny klasifikační zásady, některé z nich jsou následující: základní rozdělení variant HCV zůstává do šesti genetických skupin, bez ohledu na vzrůstající množství subtypů a variant do nich patřících. Genetické skupiny je možné označovat jako genotypy, označení skupiny jako kladu je pouze alternativní. Pro identifikaci nových genotypů je požadována důsledná a nezávislá fylogenetická analýza (Simmonds a kol., 2005).

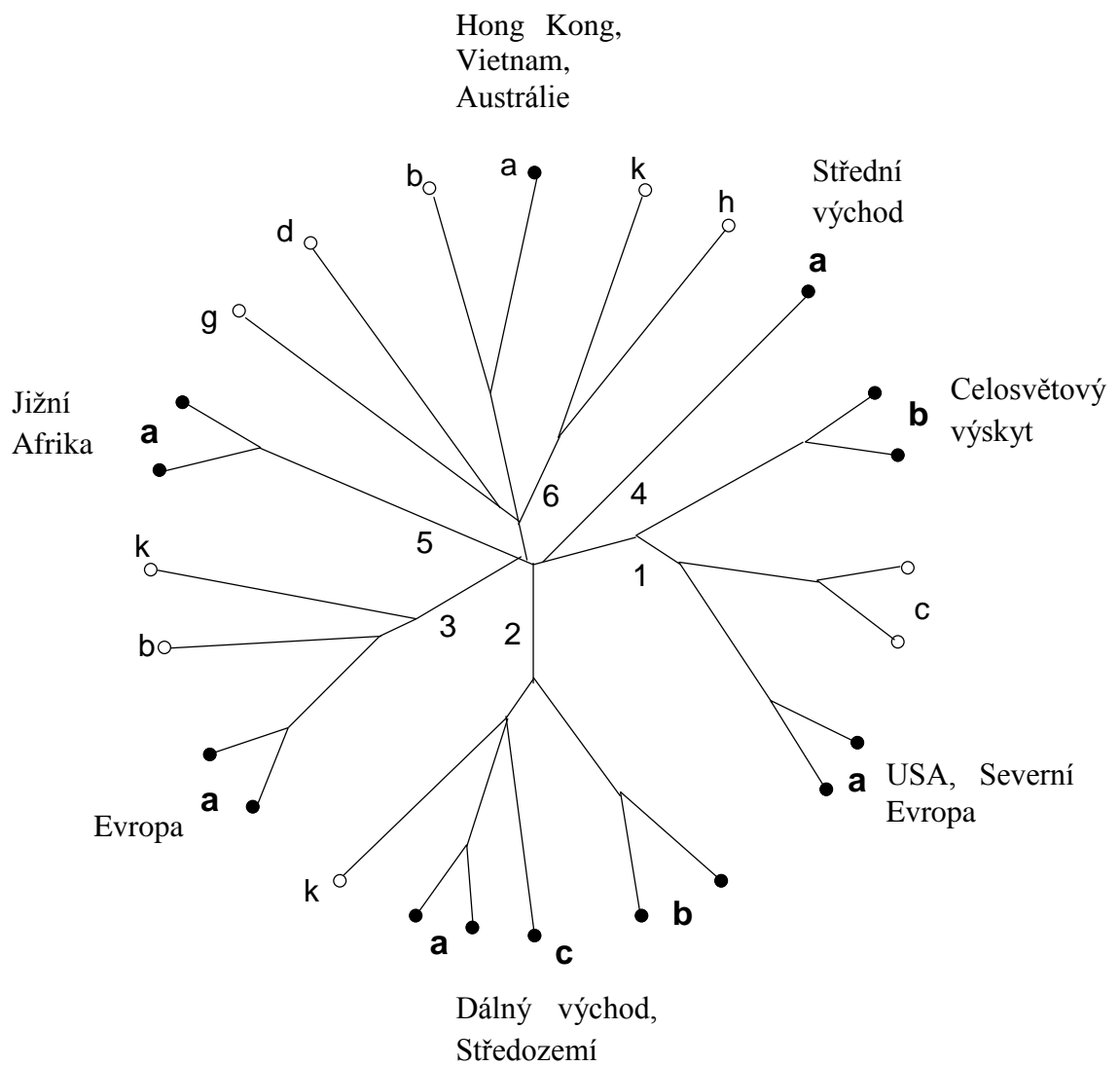
2.3.1 Identifikace genotypů

Identifikace genotypů, neboli genotypizace, je klinicky důležitá, jelikož genotypy 1 a 4 jsou více rezistentní na současnou standardní kombinovanou léčbu pegylovaným interferonem- α a ribavirinem než genotypy 2 a 3 (Hnatyszyn, 2005). Většina léčebných protokolů vyžaduje určení genotypu HCV, aby na jeho základě mohla být přesně stanovena délka léčby a dávka léku. Genotypizační testy jsou obvykle založeny na sekvenční analýze amplifikovaného segmentu genomu. Běžně se jedná o 5'UTR, jelikož je cílem většiny diagnostických testů pro detekci HCV RNA. I když je tato oblast vysoce konzervativní, vyskytuje se v ní řada dobře známých polymorfizmů, které předpovídají genotyp. Ten je pak určen hybridizací se sondou, detekcí změn v restrikčních místech nebo přímým

sekvenováním. Dosud používané testy využívající 5'UTR oblasti jsou přijatelně přesné, s více než 95% shodou s genotypy identifikovanými nukleotidovým sekvenováním NS5B oblasti, nebo jsou shodné s jinými kódujícími oblastmi genomu. Je ale nepravděpodobné, že tyto testy budou stejně spolehlivé v geografických oblastech s vysokou diverzitou HCV (Simmonds a kol., 2005). Dokonce i u dobře charakterizovaných variant HCV (jako ty, vyskytující se v západních zemích) mohou být sekvenční rozdíly v 5'UTR oblasti variabilní a nebo žádné. Například sekvenční polymorfismus v pozici 243, jenž je běžně používán pro odlišení subtypů 1a a 1b, je nespolehlivý. Byly prokázány případy, kdy došlo k nesprávnému určení 6 z 80 subtypů 1a na základně právě tohoto polymorfismu (Smith a kol., 1995). Dokonce relativně krátké kódující oblasti genomu poskytují přesnější informace o genotypu nebo subtypu HCV než oblast 5'UTR. I když klinicky tyto požadavky nejsou nutné, nukleotidové sekvence subgenomických oblastí (včetně konzervovaného genu pro kapsid) umožňují definitivní identifikaci genotypu, obecně subtypu a dokonce jsou schopné předpovědět existenci nové, dosud nepopsané varianty HCV. Pro všechny genotypizační testy, ať už jsou založené na identifikaci 5'UTR nebo jiné oblasti genomu, platí jistý předpoklad, že genotyp odvozený pouze z jedné oblasti odráží genom jako celek. Ačkoli bylo popsáno několik rekombinantních forem, šíření HCV variant jako 2k/1b a produkce dalších hybridních virů by mohlo více omezovat přesnost genotypizačních testů a důležitost v jejich klinickém užití (Simmonds a kol., 2005).



Obr. 1: Grafické znázornění genomu HCV a jeho jednotlivých úseků kódujících polyproteinový prekurzor (Podle Thurner a kol., 2004).



Obr. 2: Evoluční strom jednotlivých genotypů HCV v závislosti na rozšíření v různých oblastech světa (Podle Simmonds a kol., 2005).

2.4 Životní cyklus HCV

Obečně je první fází životního cyklu jakéhokoliv viru vniknutí virové částice do těla hostitele. To se v případě viru hepatitidy C děje přenosem tělních tekutin, převážně krví. Vstup HCV je prvním krokem interakce s cílovou buňkou, což je požadováno pro iniciaci infekce. Vstup HCV do buňky je pomalý, komplexní, mnohastupňový proces. Receptory pro virovou částici mohou být na povrchu buněk glykosaminoglykany (GAG), CD81, scavengerové receptory třídy B typu I, LDL (low-density lipoproteins) nebo lektiny vázající manózu (Helle a Dubuisson, 2008; Barth a kol., 2006). Receptory LDL a GAG zřejmě usnadňují iniciální připevnění virové částice k hostitelské buňce. Tato interakce je tedy usnadněna lipoproteiny, které jsou asociovány s viriony HCV. Po této iniciální vazbě částice interagují s CD81 nebo se scavengerovými receptory. HCV obalový protein E2 se s vysokou afinitou váže na velkou vnější smyčku CD81 (Helle a Dubuisson, 2008). Navzdory expresi všech dosud známých vstupních faktorů zůstávají mnohé lidské buněčné linie pro virus neproniknutelné. Pro buňku je tedy nutná přítomnost dalších faktorů, které jsou nezbytné pro vstup HCV. Po vniknutí zůstává virová částice navázána na receptorový komplex a dochází k internalizaci. Pouze nukleokapsid je uvolněn do buněčné cytoplasmy. Následně dochází k oddělení kapsidy a genomická HCV RNA je použita pro translaci a replikaci. Oba tyto procesy probíhají v cytoplazmě hostitelské buňky. Translace HCV RNA je iniciována vazbou virového místa IRES (Internal Ribosomal Entry Site) na ribozom hostitelské buňky. Vše se odehrává v místě drsného endoplazmatického retikula a produktem translace je pouze jediný polyprotein, jenž je následnými kotranslačními a postranslačními úpravami štěpen na samotné čtyři strukturální a šest nestrukturálních proteinů. Na sestřihu se podílí virové i buněčné proteázy. Mezi vznikající polypeptidy patří například neglykosylovaný protein kapsidy, dva povrchové glykoproteiny (které vznikají za účasti buněčných proteáz) a čtyři nestrukturální proteiny (NS2-NS5), jež vznikají štěpením virovými proteázami. HCV, stejně jako jiné jednovláknové viry pozitivní polarity, indukuje změny v buněčné membráně (Collier a Oxford, 2006; El-Hage a Luo, 2003). RNA-dependentní RNA polymeráza (NS5B protein) pak replikuje genom syntézou negativního vlákna RNA, které posléze slouží jako templát pro syntézu pozitivního vlákna RNA. Replikace a postranslační modifikace se odehrávají v místech buněčné membrány, kde dříve došlo k jejím změnám. Tato místa se vyznačují výskytem virových nestrukturálních proteinů a proteinů hostitelské buňky a označují se jako replikační komplex. Nová HCV RNA je obalena kapsidem v endoplazmatickém retikulu

hostitelské buňky a celý nukleokapsid získává své obalové proteiny v Golgiho aparátu, kde dochází k maturaci. Nově vzniklé viriony jsou uvolněny do těsné blízkosti buněk exocytózou (Penin a kol., 2004).

2.5 Epidemiologie

Vzhledem k různorodosti genotypů HCV a jejich specifickému rozšíření ve světě je zřejmé, že epidemiologie se poněkud liší pro jednotlivé oblasti. Téměř vždy se dá ale konstatovat, že v jisté míře souvisí se socioekonomickou situací daného obyvatelstva, respektive populace. Způsobů přenosu viru je hned několik. Před rokem 1986 kontrolní studie pacientů s nově získanými symptomy non-A non-B hepatitidy zjistily významnou asociaci mezi infekcí jedince a jeho půlroční historií týkající se transfuze, intravenózním užitím drog, sexuálním nebo domácím kontaktem s nemocným, vysokým počtem sexuálních partnerů a nízkou sociálně-ekonomickou úrovní. Perkutánní vystavení infekci, jako je transfuze krve a krevních derivátů nebo transplantace orgánů a tkání z nemocných dárců a sdílení kontaminovaných jehel mezi i. v. narkomany, je spojováno s nejvíce účinným přenosem HCV. Skupinami s naprosto nejvyšší prevalencí anti-HCV dosahující až 90 % jsou hemofilici, podstupující četné transfuze krve, ve kterých se často nacházely neléčitelné koncentrace viru a také i. v. narkomani. HCV je dnes jen zřídka přenášen transfuzí, jelikož se provádí testy krve, které vyloučí infikované dárce. Současný odhad získání infekce při transfuzi se pohybuje mezi 0,01 % až 0,001 %. Distribuce běžně rozpoznávaných rizikových faktorů podle pacientů s akutní hepatitidou C je následující: i. v. narkomani 43 %, sexuální riziko 15 %, transfuze 4 %, domácí prostředí 3 %, povolání 4 %, jiná vysoká rizika 30 %, neznámá rizika 1 % (Alter, 1997).

Parenterální přenos HCV je nejčastějším způsobem přenosu a zároveň je to také nejsnadnější cesta. Mezi rizikové faktory parenterální infekce HCV patří: transfuze krve a krevních derivátů, i. v. narkomanie, dialýza, transplantace orgánu a chirurgické zákroky, jaterní onemocnění vyskytující se v rodině, postižení jater vlivem alkoholu, sexuální kontakt, profesionální nákazy a pobyt v endemické oblasti. Může také docházet ke kombinaci několika z výše uvedených rizikových faktorů. O sporadickou infekci se pak jedná přibližně v 12 % až 13 % případů. Nejvíce infekčním materiálem je krev nemocného, dále pak také sliny, které

mohou obsahovat virovou RNA. Přenos slinami však nastává pouze po jejich kontaktu s krví, například při pokousání a podobně.

Výskyt protilátek u pacientů stoupá s věkem, nerozlišují se rozdíly mezi pohlavími ani geografickými oblastmi (Stránský, 1999).

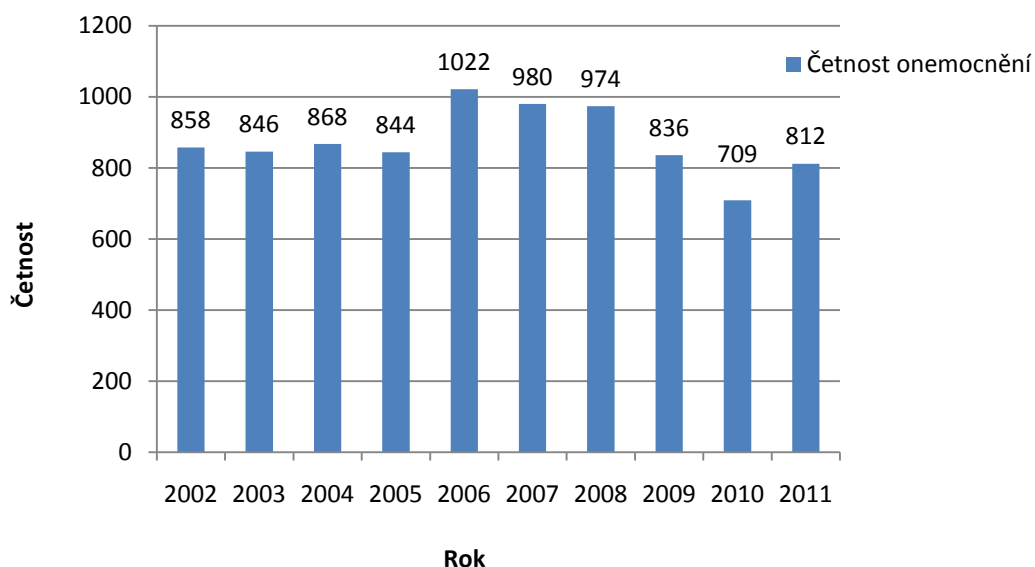
2.5.1 Epidemiologie v ČR

Způsoby nákazy a přenosu viru hepatitidy C jsou v České republice prakticky shodné s cestami přenosu (a epidemiologií celkově) ve světě. Ovšem ve 20-25 % případů není nikdy objasněno, jakému z rizikových faktorů byl nakažený jedinec vystaven (Ehrmann a Hůlek, 2010). Kolísání počtu nově nakažených je zaznamenáno v tabulce (Tab. I) a následně pak zobrazeno v grafu 1. Ten zobrazuje počet nově nakažených v období od roku 2002 až do roku 2011. V České republice se prevalence genotypu 1b pohybuje kolem 75-80 %.

Tab. I: Počet nově nakažených v letech 2002-2011.

Rok	Počet nakažených
2002	858
2003	846
2004	868
2005	844
2006	1022
2007	980
2008	974
2009	836
2010	709
2011	812

Graf 1: Výskyt počtu nově nakažených jedinců v ČR v období let 2002-2011.



Zdroj dat: <http://www.szu.cz>

2.6 Patogeneze

Virus hepatitidy C je celosvětově hlavní příčinou chronických jaterních nemocí. Chronická hepatitida typu C je hlavním důvodem výskytu cirhózy jater a hepatocelulárního karcinomu a v mnoha zemích jsou právě tyto dva problémy příčinou transplantace jater. Infekce HCV je typická svou náchylností k chronicitě. Díky své genetické variabilitě má HCV schopnost unikat imunitnímu systému hostitele. Infekce HCV není přímo cytopatická, poškození jaterních buněk je zprostředkováno imunitními mechanismy. Kofaktory, které ovlivňují konečný výsledek infekce, jako je věk, pohlaví a množství konzumovaného alkoholu, jsou jen málo prozkoumány a jejich vliv na průběh infekce není zcela prokázán. Ostatní faktory – imunologické a genetické – však hrají důležitou roli. Vážnost jaterního poškození se pohybuje od asymptomatických případů s normálními výsledky jaterních testů až po již zmíněné případy s výskytem cirhózy a hepatocelulárního karcinomu (Boyer a Marcellin, 2000).

2.6.1 Mechanismy perzistence HCV

Kvalita buněčné imunitní odpovědi je rozhodující pro eliminaci nebo naopak perzistenci HCV v organismu. Důležitou funkci v imunopatogenezi HCV mají CD4+ T-lymfocyty a jejich cytokiny se zánětlivými a regulačními funkcemi. Tyto T-lymfocyty se diferencují na dva typy pomocných T-lymfocytů (Th lymfocyty), a to typy Th1 a Th2. Th1 buňky produkují interleukin 2 (IL-2) a interferon gama, což jsou hlavní podněty pro rozvoj hostitelské antivirové imunitní odpovědi, včetně produkce cytotoxických T-lymfocytů (CTL) a aktivace NK buněk (natural killers; přirození zabíječi). Naproti tomu Th2 buňky produkují interleukin 4 a interleukin 10 (IL-4 a IL-10), které zvyšují produkci protilátek, zároveň ale snižují odpověď Th1 lymfocytů. Tato nerovnováha mezi oběma typy pomocných T-lymfocytů (Th1 a Th2) je možnou příčinou neschopnosti organismu eliminovat infekci HCV (Boyer a Marcellin, 2000).

Pacienti trpící akutní HCV infekcí, u kterých došlo k samovolnému potlačení infekce, vykazovali silnou odpověď Th1 T-lymfocytů a slabou nebo dokonce žádnou odpověď Th2 T-lymfocytů. Naopak pacienti, u kterých došlo k chronickému rozvoji infekce, vykazovali převážně odpověď Th2 a jenom slabou odpověď Th1 T-lymfocytů (Gonzales-Peralta a kol., 1992). Tato pozorování pak naznačují, že působení Th1 cytokinů je stěžejní pro ochranu organismu proti infekci HCV, zatímco produkce Th2 cytokinů, jež je preferována, může mít inhibiční efekt na imunitní systém pacienta a tím pádem umožňuje perzistenci HCV infekce. Primární příčiny této časně imunitní odpovědi u akutní infekce nejsou známy, nicméně změna poměru těchto cytokinů může být využita při léčbě chronické hepatitidy typu C.

Výskyt infekce HCV byl prokázán v mononukleárních buňkách periferní krve, v monocytech a lymfocytech. Mimoto však byla detekována záporně nabitá RNA v hematopoetických buňkách, z čehož plyne, že replikace viru HCV je možná i v extrahepatálním prostředí, tedy mimo játra (Lerat a kol., 1996). Tento extrahepatální výskyt infekce může taktéž hrát svou roli v mechanismu perzistence HCV v organismu. Je možné, že tímto způsobem dochází ke změně imunitního systému nebo k preferenci infekce jaterních buněk. Buněčný protein označovaný jako CD81 (který váže virový protein E2) je exprimován na povrchu několika typů buněk, včetně lymfocytů a hepatocytů, a je označován jako receptor pro HCV (Pileri a kol., 1998).

Produkce protilátek je kritická pro neutralizaci volných virových částic a pro prevenci vstupu viru do hostitele. Studie ukazují, že navzdory rozvoji nemoci v chronickou infekci, dochází v organismu k produkci neutralizačních protilátek (Shimizu a kol., 1994). Nejvíce pravděpodobné vysvětlení pro neúčinnost odpovědi protilátek proti HCV je rychlý vznik virových mutací. Tím virus zabráni původně vytvořeným neutralizačním protilátkám k rozpoznání nově vzniklých epitopů mutovaného viru (Farci a kol., 1994).

2.6.2 *Heterogenita HCV*

Kromě výše zmíněných mechanismů perzistence viru hepatitidy C v organismu je dalším důležitým prvkem pro přežití HCV jeho variabilita a heterogenita. Únik protilátkám a odpovědi CTL je výsledkem mutací v důsledku vysoké variability HCV. Virová RNA-dependentní RNA polymeráza je vysoce náchylná k produkci chyb a postrádá sebeopravnou funkci. Odhadovaná frekvence spontánních nukleotidových substitucí je velmi vysoká, přibližně 10^{-2} - 10^{-3} substitucí na nukleotid za rok. Díky těmto substitucím se v jedné populaci vyskytují heterogenní viriony lišící se nukleotidy o 1-9 % (Bukh a kol., 1995). Biologickým důsledkem vznikajících mutací je tedy únik humorální i buněčné imunitě, vznik buněčných tropismů (lymfotropismus, hepatotropismus) zapříčiňujících selhávání vakcín a také rozvoj lékové rezistence. HCV se vyznačuje vysokou genetickou variabilitou, především v oblastech genomu kódujících proteiny E2 a NS1. Tyto dvě oblasti se nazývají hypervariabilní a označují se HVR1 a HVR2 (Hijikata a kol., 1991; Weiner a kol., 1991). Vysoká četnost mutací v těchto oblastech je výsledkem selektivního tlaku hostitelského imunitního systému. Vznik neutralizačních protilátek proti HCV je možný, ale extrémně vysoký stupeň variability HVR1 a HVR2 umožňuje selekci mutantů, proti nimž zatím nebyly protilátky syntetizovány. Vše je ještě podpořeno vysokou rychlostí množení viru v organismu hostitele, kde dochází ke vzniku 10^{10} - 10^{12} virionů za den (Neumann a kol., 1998).

2.7 Klinický obraz onemocnění

Klinický obraz hepatitidy C může být poměrně rozličný a při jeho studiu je nutno počítat s několika nevýhodami. Mezi ně patří například obtížné zjištění doby získání infekce, asymptomatický průběh primární infekce a nakonec velmi pomalý rozvoj onemocnění. Přibližně v 75-80 % případů infekce HCV dochází k přechodu z akutního onemocnění na chronické. Množství případů je ale ovlivněno věkem, pohlavím, rasou a imunitní odpovědí. Je tedy zřejmé, že klinický průběh akutní a chronické infekce HCV se bude také poněkud lišit (Sarin a Kumar, 2012).

2.7.1 Akutní infekce HCV

Akutní infekce HCV bývá jen ojediněle diagnostikována, a to zejména proto, že průběh akutní infekce HCV je u většiny případů bezpříznakový. Infekci lze označit za akutní v případě, že v době jejích klinických příznaků byla stanovena doba nakažení v průběhu posledních šesti měsíců. O akutní infekci se jedná v méně než 15 % případů nově vzniklých infekcí a přibližně u 20-30 % případů akutní infekce dospělých dojde později k přechodu do její chronické formy. První z detekovatelných příznaků se začínají objevovat přibližně 3 až 12 týdnů po vystavení infekci. Mezi jedny z prvních symptomů se řadí nevolnost, slabost, nechutenství a žloutenka. Mezi další průvodní jevy onemocnění patří zejména nespecifické příznaky, nevyskytují se ani extrahepatální příznaky, jako tomu je v případě podobné hepatitidy typu B. I při možné absenci vizuálních příznaků je však typické zvýšení hladiny sérové alanin aminotransferázy (ALT) 2 až 8 týdnů po infekci. Jedná se o enzym běžně se vyskytující v játrech a jeho stanovení je základním diagnostickým vyšetřením pro zhodnocení zdravotního stavu jater. Hladina tohoto enzymu se v případě akutní infekce HCV může zvýšit až desetinásobně oproti horní hranici normálního stavu. V případě akutní infekce je dále možné detekovat HCV RNA v séru pacienta a to přibližně 1 až 2 týdny po vystavení infekci. Hladina HCV RNA výrazně stoupá v prvních několika týdnech po infekci a její hodnoty vrcholí v rozmezí 10^5 a 10^7 IU/ml v době, kdy se začíná zvyšovat hladina ALT a začínají se objevovat příznaky (Ehrmann a Hůlek, 2010; Thimme a kol., 2001).

2.7.2 Chronická infekce HCV

Za chronickou infekci jsou považovány všechny případy přenosu, ke kterým došlo dříve než před šesti měsíci od klinických projevů nemoci. Chronická virová hepatitida je mnohem častější variantou onemocnění než její akutní forma. Taktéž u chronické infekce HCV jsou její klinické příznaky zcela nespecifické, velmi často dokonce žádné, a pouhou náhodou dojde k odhalení infekce při jiných obtížích. Viditelný projev příznaků pak nastává v pokročilejších stádiích nemoci, kdy dochází k cirhóze jater nebo ke vzniku hepatocelulárního karcinomu. Přirozený průběh neléčené infekce není zcela znám, především díky včasné zahajovaným antivirovým léčbám (Ehrmann a Hůlek, 2010). Míra rozvoje chronické infekce je ovlivňována mnoha faktory. Patří mezi ně například věk v čase nakažení, pohlaví, etnická příslušnost a vývoj žloutenky v době akutní fáze infekce. V menší míře se objevuje chronická infekce u jedinců do 25 let (přibližně 56 %), u jedinců starších 25 let dojde k rozvoji chronické infekce přibližně v 87 % případů (Bellentani a Tiribelli, 2001). Co se pohlaví týká, chronickou infekcí HCV trpí méně ženy, obzvláště v mladém věku. Z etnického hlediska jsou k chronicitě HCV více náchylní Afroameričané, na druhou stranu menší výskyt chronicity byl prokázán u jedinců, u kterých došlo k projevu příznaků a vzniku žloutenky již v akutní fázi infekce. Dalším významným faktorem ovlivňujícím infekci HCV jsou genetické predispozice hostitelského organismu. Genetická modifikace hostitele totiž ovlivňuje heterogenitu clearance mezi jedinci. Varianty genů, které jsou zahrnuty v imunitní odpovědi, jsou spojovány s výslednou akutní infekcí HCV a na jejich základě je ovlivňována síla a kvalita imunitní odpovědi jedince (Sarin a Kumar, 2012).

2.8 Laboratorní diagnostika

Metody k detekci infekce HCV se většinou dělí na sérologické metody, kdy se v séru pacienta detekuje přímo přítomnost protilátek k HCV, tedy anti-HCV; druhou možností ke zjištění infekce v organismu jsou metody molekulárně genetické, jimiž je možno detekovat samotnou virovou nukleovou kyselinu - HCV RNA (Ehrmann a Hůlek, 2010).

2.8.1 Sérologické detekční metody

Přítomnost protilátek anti-HCV u nemocného je důkazem kontaktu jedince s HCV. Anti-HCV protilátky nejsou neutralizačního charakteru, jejich přítomnost tedy nevyvolává následnou imunitu organismu. Ve značné míře protilátky přetrvávají u pacientů úspěšně vyléčených protivirovou terapií a stejně tak i u pacientů, u kterých došlo ke spontánní eliminaci viru. Protilátky se nejčastěji detekují metodou EIA (enzymová imunoanalýza), jejíž specificita i senzitivita se pohybují kolem 98 %. Při enzymové imunoanalýze jsou k vazbě na stěny mikrotitrační destičky použity rekombinantní antigeny. Protilátky se naváží na antigeny a jejich přítomnost je pak prokázána vazbou sekundárních protilátek, které jsou značené enzymem. Tento enzym katalyzuje rozklad přítomného substrátu na barevný produkt a tím je vizualizovaná přítomnost protilátek. Pouhá detekce protilátek ke stanovení přítomnosti HCV v organismu ale není dostačující (Ehrmann a Hůlek, 2010; Chavaliez, 2011). Při akutní infekci nemusí být anti-HCV detekovatelné u všech pacientů, i když hladiny ALT jsou zvýšené. Detekce anti-HCV je pak možná až o několik týdnů později (Puoti a kol., 1992). Navíc u pacientů s potlačenou funkcí imunity (například pacienti s koinfekcí HIV) je hladina anti-HCV nedetekovatelná po celou dobu infekce HCV (Marcellin a kol., 1994).

Pro detekci anti-HCV je k dispozici řada antigenů odvozených z proteinu nukleokapsidu nebo z několika nestrukturálních proteinů (NS3, NS4 a NS5). Žádný z komerčně dostupných testů ale neobsahuje antigeny odvozené z celého genomu, což zvyšuje možnost, že sérum obsahující pouze úzké spektrum antivirových specifí poskytne falešně negativní výsledky. Genomická variabilita je pak problémem při detekci, kdy protilátky získané proti jednomu z genotypů nemusí reagovat s genotypem jiným (Irving, 2002).

2.8.2 Molekulární biologie a hepatitida C

Molekulárně genetickými metodami lze prokázat přítomnost virové nukleové kyseliny přímo ze séra (nebo tkáně) infikovaného jedince. Ke kvantitativnímu stanovení viremie je v současnosti používána mezinárodní jednotka (IU) v jednom mililitru séra (IU/ml). Nejrozšířenější metodou k amplifikaci virové nukleové kyseliny je v dnešní době PCR (polymerázová řetězová reakce; Polymerase Chain Reaction). Přítomnost HCV RNA v periferní krvi je spolehlivým markerem virové replikace. HCV RNA může být detekována

jeden až tři týdny po infekci, což je přibližně jeden měsíc před objevením anti-HCV protilátek. Molekulárně genetickými metodami lze kromě kvantitativního stanovení provést zároveň i genotypizaci virové nukleové kyseliny (Ehrmann a Hůlek, 2010; Pawlotsky, 2002). Technika real-time PCR (PCR v reálném čase) má široký dynamický rozsah v kvantifikaci, navíc je citlivější než klasická technika PCR. Tyto metody svým uspořádáním minimalizují falešně pozitivní výsledky způsobené zejména kontaminací amplikonem z předchozích analýz a mohou být i plně automatizovány. Z těchto důvodů je real-time PCR preferenčně používána pro detekci HCV RNA v klinické praxi (Chavaliéz, 2011).

3 PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Cíl práce

Vypracovat teoretickou práci o významu hepatitidy C a metodách laboratorní diagnostiky. Praktické seznámení se základními laboratorními metodami z oblasti molekulární biologie. Ověření metody pro určení genotypů HCV analýzou pěti vzorků pacientů v Laboratoři molekulární biologie Fakultní nemocnice Olomouc.

3.2 Materiál a metodika

3.2.1 Přístroje a pomůcky

Pro provedení praktické části byly v jednotlivých krocích použity následující přístroje a pomůcky.

Pro izolaci HCV RNA:

- Laminární box MSC 12, Jouan, Francie
- Centrifuga BR4i, Jouan, Francie
- Vortex UNIMAG-ZX3, UniEquip, Německo
- Mikropipety 2-20 μl (20-200 μl), Autoclavable Nichipet, NICHIRYO, Japonsko
- Mikropipeta 100-1000 μl , Hamilton, Švýcarsko
- 1,5ml mikrozkušavky, Eppendorf, Německo
- Centrifugační kolonky, GeneProof, Česká republika
- 2ml sběrné zkušavky, GeneProof, Česká republika
- Špičky, Eppendorf, Německo

Pro provedení RT-PCR:

- Termocyklér CFX 96, Bio-Rad, USA
- Software Bio-Rad CFX Manager 2.1, BioRad, USA
- Počítač
- Centrifuga BR4i, Jouan, Francie
- Vortex UNIMAG-ZX3, UniEquip, Německo
- Mikropipeta 0,1-2 μl TIPOR-V+, Orange Scientific, Belgie
- Mikropipeta 2-20 μl (20-200 μl), Autoclavable Nichipet, NICHIRYO, Japonsko
- Mikropipeta 100-1000 μl , Hamilton, Švýcarsko
- 1,5ml mikrozkušavky, Eppendorf, Německo
- Špičky, Eppendorf, Německo

Pro provedení reverzní hybridizace:

- Třepačka Wellmix, Ani Labsystems Ltd., Finsko
- Termostat M, MLW
- Mikropipeta 2-20 μ l (20-200 μ l), Autoclavable Nichipet, NICHIRYO, Japonsko
- Teploměr
- Hybridizační proužky, NLM diagnostici, Itálie
- Plastová vanička, NLM diagnostici, Itálie
- Interpretační kartička, NLM diagnostici, Itálie
- Mikropipeta 100-1000 μ l, Hamilton, Švýcarsko
- Špičky, Eppendorf, Německo

3.2.2 Chemikálie

Pro izolaci virové nukleové kyseliny byl použit izolační kit od firmy GeneProof s označením „PathogenFree RNA isolation kit Cat. No. IRNA050“. Obsahem tohoto kitu jsou následující chemikálie:

- lyzační pufr RAV1
- promývací pufr RAW
- promývací pufr RAV3 (koncentrát)
- RNase-free voda
- eluční pufr RE
- lyofilizovaný RNA nosič

Další chemikálií nutnou k izolaci HCV RNA je 96% etanol.

Všechny komponenty kitu lze skladovat při pokojové teplotě (20-25 °C) po dobu maximálně jednoho roku; lyzační pufr RAV1 s nosičem RNA lze skladovat 1-2 týdny při pokojové teplotě, po tuto dobu nedochází ke vzniku precipitátu, skladování při teplotě 4 °C je možné po dobu čtyř týdnů a pro dlouhodobé uchování se doporučuje zamražení při teplotě -20 °C. Dojde-li ke vzniku precipitátu, je nutné jej odstranit zahřátím na teplotu 40-60 °C na dobu maximálně pět minut; zahřátí se nedoporučuje provádět více jak 4x. Promývací pufr

RAV3 s etanolem lze skladovat při pokojové teplotě (20-25 °C) po dobu maximálně jednoho roku.

Před samotnou izolací je nutné rozpustit lyofilizovaný RNA nosič v 1 ml lyzačního pufru RAV1 a tuto směs následně vrátit do původní lahvičky s RAV1. Dojde-li však při reakci ke vzniku precipitátu, je nutné jej před samotnou izolací odstranit. Dalším krokem před izolací je smíchání 12,5 ml koncentrovaného pufru RAV3 s 50 ml 96% etanolu a v neposlední řadě je třeba přehřát RNase-free vodu na teplotu 70 °C.

Izolace se provádí z biologického materiálu pacientů:

- plná krev
- sérum
- plazma

V našem případě byly použity sérové vzorky pacientů s již určeným genotypem, které byly zamrazeny na -70 °C.

Před použitím je vhodné vzorky vytemperovat na laboratorní teplotu, promíchat na vortexu a krátce stočit na centrifuze. Uchování vzorků plné krve je možné po dobu maximálně 6 hodin při teplotě 2-25 °C; sérum nebo plazmu je možné uchovat po dobu maximálně tří dnů při teplotě 2-8 °C, v případě delšího uchování je možné vzorky séra a plazmy zamrazit na teplotu nižší než -70 °C; zamražení a rozmražení vzorků je možné provést v každém případě maximálně 3x.

Pro reverzní transkripci a PCR byl použit „RT-PCR mix for kit GEN-C“ firmy NLM diagnostici, kat. číslo AC032. Soupravu je nutné uchovávat v mrazicím boxu při teplotě -20 °C. Součástí kitu jsou následující chemikálie:

- HCV-RT MIX
 - Tris HCl
 - MgCl₂
 - DTT
 - dNTPs < 0,006 %
 - sense primer < 0,002 %
 - antisense primer < 0,003 %

- ribonukleázový inhibitor (40U/ μ l)
 - HEPES-KOH
 - KCl
 - DTT
 - Glycerol

- reverzní transkriptáza (200U/ μ l)
 - Tris HCl
 - NaCl
 - EDTA
 - DTT
 - Nonidet
 - Glycerol

- DNA polymeráza

Při přípravě mixu je nutné pracovat s reagensy i s RNA vzorky na ledu. Pro jeden vzorek se do zkumavky pipetuje HCV MIX o objemu 32,6 μ l; dále ribonukleázový inhibitor 1,2 μ l; reverzní transkriptáza 0,6 μ l a DNA polymeráza o objemu 0,6 μ l. PCR mix se připravuje vždy pro daný počet reakcí zvětšený o jednu. Do každé označené PCR zkumavky se pipetuje PCR mix o objemu 35 μ l a následně se přidá 25 μ l izolovaného vzorku RNA, směs se musí opatrně promíchat. Takto připravené vzorky se vloží do termocykléru a spustí se vhodný program.

Pro reverzní hybridizaci se používá souprava „GEN-C Reverse Hybridization Strip Assay“ od firmy NLM diagnostics, kat. číslo AC004. Soupravu je nutno uchovávat v lednici. Souprava pro reverzní hybridizaci obsahuje následující chemikálie:

- denaturační roztok
- hybridizační pufr
- promývací roztok A
- promývací roztok B
- konjugát

- substrát

Před genotypizací je nutno vytemperovat vodní lázeň i termostat na teplotu 45 °C.

3.2.3 Izolace HCV RNA

Izolace genomové RNA virů je poněkud složitější než izolace genomové DNA. RNA může být velmi snadno rozložena všudypřítomnými RNázami, je tedy nutné při izolaci genomové RNA zajistit ochranu před jejím rozkladem. RNázy jsou velmi stabilní enzymy, které odolávají velkému množství chemických činidel a jsou také odolné teplotním změnám. Nejčastěji používaný inhibitor RNáz je guanidin thiokyanát (GTC) (Růžičková, 2005). Samotná izolace HCV RNA byla provedena níže popsáním způsobem.

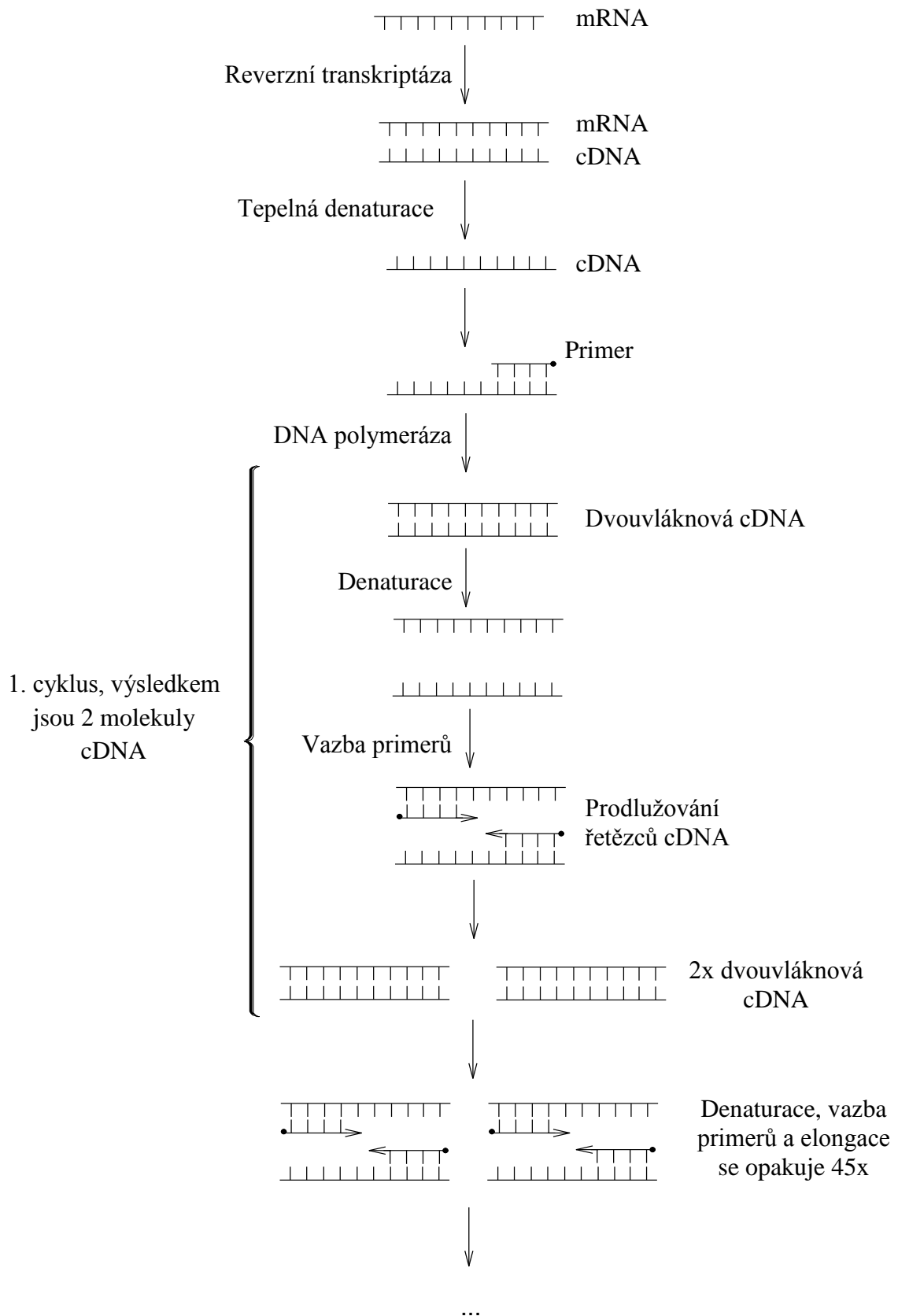
Ke 150 µl vzorku se napipetuje 600 µl pufru RAV1. Směs se promíchá, vortexuje a inkubuje 5 minut při teplotě 70 °C. Pokud zůstane roztok zakalený, musí se centrifugovat po dobu 1 minuty při 11.000 x g a vzniklý supernatant je nutné odstranit. Dále se ke směsi přidá 600 µl 96% etanolu, vše se vortexuje a krátce stočí. 700 µl z takto upraveného lyzovaného vzorku se přenesou na kolonku, která je vložena ve sběrné zkumavce. Následuje centrifugace po dobu 1 minuty a přetížení 8.000 x g. Kolonky se přenesou do nových sběrných zkumavek a zbytek lyzovaného roztoku se přenesou na kolonku. Opět se provede centrifugace po dobu 1 minuty při přetížení 8.000 x g a kolonky se musí opět přenést do nových sběrných zkumavek. Na kolonku se nanese 500 µl RAW pufru a centrifuguje se při 8.000 x g po dobu jedné minuty. Obsah sběrných zkumavek se vylije, na kolonku se nanese 600 µl RAV3 pufru a provede se centrifugace za stejných podmínek (8.000 x g po dobu jedné minuty). Sběrné zkumavky i s obsahem se vyhodí, kolonky se vloží do nových sběrných zkumavek a přidá se 200 µl RAV3 pufru. Aby došlo ke kompletnímu odstranění pufru z kolonky, je nutné provést centrifugaci, tentokrát při přetížení 11.000 x g po dobu 2-5 minut. Kolonka se následně vloží do nové 1,5ml mikrozukmavky Eppendorf, na kolonku se nanese RNase-free voda předeřhřátá na 70 °C a vše se nechá inkubovat 1-2 minuty. Na závěr se provede centrifugace, která trvá 1 minutu při přetížení 11.000 x g (User Manual, PathogenFree RNA Isolation Kit, GeneProof). Izolovaná HCV RNA zůstane na dně mikrozukmavky a použije se k následné RT-PCR .

3.2.4 PCR a RT-PCR

PCR (polymerázová řetězová reakce; Polymerase Chain Reaction) jako taková byla zavedena jako metoda molekulární biologie Kary B. Mullisem v roce 1985. Mezi její hlavní výhody patří to, že umožňuje amplifikaci DNA, aniž by musela být předem klonována ve vektorech. PCR vychází ze základního molekulárního mechanismu všech živých organismů – je založena na replikaci nukleových kyselin. Ve své podstatě dochází při PCR k syntéze nových řetězců konkrétních úseků dvouvláknové DNA, a to při cyklicky se opakujících enzymových syntézách. Prostřednictvím DNA polymerázy dochází k syntéze nových vláken DNA ve směru $5' \rightarrow 3'$. Úseky, jež jsou syntetizovány při reakci, jsou vymezeny vazbou dvou primerů. Ty se váží na protilehlá vlákna DNA tak, aby jejich 3'-konce byly nasměrovány proti sobě. V reakční směsi je přítomná DNA polymeráza a volné nukleotidy. DNA polymeráza pak na volné 3'-OH konce primerů přidává nukleotidy komplementárně k templátovému vláknu. K syntéze dochází na obou matricových vláknech zároveň, ale v opačných směrech. Jelikož PCR probíhá za vysokých teplot, je nutné, aby použitá DNA polymeráza (popřípadě jiné enzymy) byla termostabilní. Pro syntézu DNA pomocí PCR se tedy používají termostabilní polymerázy původně se vyskytující v termofilních mikroorganismech. Například *Taq* DNA polymeráza vyznačující se DNA-dependentní DNA polymerázovou aktivitou, která odolává denaturačním teplotám DNA, byla izolována z bakterie *Thermus aquaticus*. Tímto způsobem je zajištěno, aby k syntéze DNA docházelo opakovaně ve formě cyklů. Každý z cyklu je sestaven ze tří po sobě následujících kroků, které jsou závislé na teplotě reakční směsi. Jedná se tedy o tři odlišné děje mající specifické nároky na teplotu. Prvním krokem je v běžné PCR denaturace dvouřetězcových molekul DNA při teplotě $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, druhým krokem je připojení primerů k již odděleným jednovláknovým řetězcům DNA při teplotě $30\text{-}65\text{ }^{\circ}\text{C}$ a posledním, třetím krokem je vlastní syntéza nových molekul DNA prostřednictvím DNA-polymerázy za teploty $65\text{-}75\text{ }^{\circ}\text{C}$. Reakce PCR probíhají v zařízení zvaném termocyklér. Jedná se o přístroj, kde se teplota cyklů mění v časových intervalech zcela automaticky. Opakováním cyklů se exponenciálně zvyšuje množství kopií původní DNA, kdy dochází ke vzniku 2^n kopií, kdy „n“ je rovno počtu cyklů. Takovým způsobem je možné při 32 cyklech získat až jednu miliardu kopií původní DNA (Pantůček a Doškař, 2005).

Pro amplifikaci nukleové kyseliny HCV se však používá modifikace PCR, a to tzv. PCR spojená s reverzní transkripcí (RT-PCR). Reverzní transkripce (RT) je nutná z toho

důvodu, že genomem HCV není dvouvláknová DNA, ale jednovláknová RNA. Ta nemůže sloužit jako templát, je tedy nutné ji nejprve převést do cDNA (komplementární DNA), a to za pomoci retrovirové reverzní transkriptázy (izolované například z AMV – Avian myeloblastosis virus). Jako alternativu k reverzní transkriptáze je možné použít i termostabilní *Tth* DNA polymerázu izolovanou z *Thermus thermophilus*. Tato polymeráza je v přítomnosti manganatých iontů (Mn^{2+}) schopná RNA-dependentní DNA polymerázové aktivity a účinně a specificky převádí RNA na DNA při teplotě 72 °C. K iniciaci RT-PCR se běžně používá oligo(dT)-primer. Jelikož ale HCV RNA není polyadenylována, rozeznává tento primer náhodné hexanukleotidy na konci RNA a z tohoto místa začíná syntéza. Následná amplifikace cDNA pak probíhá stejným postupem, který byl popsán výše, liší se pouze teplotním profilem jednotlivých kroků a úvodní reverzní transkripcí (Pantůček a Doškař, 2005). Vazba primerů pro reverzní transkripci se odehrává při teplotě 37 °C po dobu 45 minut, následuje samotná reverzní transkripce za účasti reverzní transkriptázy a vznik cDNA. Při teplotě 94 °C po dobu 5 minut pak dochází k počáteční denaturaci komplexu RNA a cDNA. Při stejné teplotě po dobu 30 sekund probíhá denaturace cDNA, na ni navazuje „annealing“ (připojení primerů) za teploty 50 °C po dobu 30 sekund a nakonec elongace řetězce DNA probíhá při teplotě 72 °C v průběhu 45 sekund. Poslední tři kroky jsou v případě amplifikace HCV RNA opakovány 45x, finálním krokem probíhajícím v termocykléru je ochlazení amplikonů na 4° C, což je teplota, při níž lze produkty PCR uchovávat, následuje-li jejich použití pro genotypizaci tentýž den. V případě delšího uchování produktů RT-PCR je nutné jejich uložení při teplotě -20 °C. Schéma RT-PCR je znázorněno na obrázku 3 (Obr. 3). V průběhu toho kroku dochází k amplifikaci nepřekládané oblasti na 5'-konci genomu (5'-UTR). Tato oblast je důležitá pro určení genotypů HCV. Jedná se o velice konzervativní oblast genomu, ale na druhou stranu se v ní vyskytují specifické, dobře popsané polymorfizmy, na jejichž základě lze určit, o jaký typ HCV se jedná (User manual, RT-PCR mix for GEN-C kit (AC004), NLM diagnostici).



Obr. 3: Schematické znázornění průběhu RT-PCR.

3.2.5 Reverzní hybridizace

Základním materiálem pro metodu reverzní hybridizace byla v našem případě extrahovaná RNA, izolovaná ze séra pacienta a amplifikovaná pomocí RT-PCR. Při RT-PCR jsou primery značeny biotinem a jsou komplementární k 5'UTR oblasti, která je nepřekládaná a nachází se na 5'-konci genomu. Virová RNA, jež byla amplifikována v RT-PCR, následně hybridizuje již v podobě DNA se sondami. Ty jsou v paralelních liniích přichyceny k membráně. Detekce hybridizovaných sekvencí se pak provádí streptavidinem navázaným na alkalickou fosfatázu. Alkalická fosfatáza pak rozkládá přítomný substrát za vzniku specifického zbarvení membrány v místech, kde jsou navázány sondy. Genotypizace HCV je omezena na takové genotypy HCV, pro které jsou sondy komerčně dostupné, a které jsou současně klinicky relevantní. (Růžičková, 2005).

Genotypizací pomocí GEN-C Reverse Hybridization Strip Assay je možné identifikovat genotypy 1a-1c, 2a-2d, 3a-3f, 4a-4k, 5a, 6a, 10a.

Samotná hybridizace probíhá při teplotě 45 °C. Je tedy nutné připravit třepačku s vodní lázní a to tak, aby hladina vody sahala přibližně do poloviny výšky plastového stojánku. Vodní lázeň je nutné vytemperovat na 45 °C ± 5 °C. Dále je nutné předeřhát hybridizační pufr a promývací roztok A na teplotu 45 °C, aby došlo k rozpuštění precipitátu. Do každé linie stojánku se napipetuje 30 µl denaturačního roztoku a následně se do této kapky přidá 30 µl amplifikačního produktu a směs se propipetuje. Roztok se po přidavku vzorku zabarví modře. Směs se inkubuje 5 minut při pokojové teplotě. Následně se do každé linie stojánku přidá 1 ml hybridizačního pufru předeřhátého na 45 °C. Směs se jemně promíchá a modré zbarvení se vytratí. Při přidávání hybridizačního pufru je nutné použít pro každou linii novou špičku pipety, aby nedošlo ke kontaminaci mezi vzorky. Pro každý vzorek se vyjme jeden strip ze soupravy. Vyjmutí je nutné provádět v rukavicích a čistou pinzetou, každý strip se pak označí obyčejnou tužkou a vloží se označenou stranou nahoru do odpovídající linie a je nutné jej celý potopit. Proužky se inkubují 30 minut ve vodní lázni o teplotě 45 °C za stálého promíchávání.

Následujícím krokem je promývání proužků, které také probíhá při teplotě 45 °C. Po ukončení hybridizace se stojánek vyjme z vodní lázně a z každé linie stojánku se opatrně odsaje zbylý roztok pipetou. Do každé linie se přidá 1 ml promývacího roztoku A o teplotě 45 °C a krátce se stripy opláchnou. Roztok se odsaje a znovu se přidá promývací roztok A o stejné teplotě do každé linie. Proužky s promývacím roztokem A se inkubují po dobu

15 minut na vodní lázni o teplotě 45 °C, vzorky je nutné stále protřepávat na třepačce rychlostí přibližně 50 rpm. Roztok se odstraní pipetou, do třetice se přidá 1 ml promývacího roztoku A přehřátého na 45 °C a opět se provede inkubace po dobu 15 minut na třepačce ve vodní lázni o teplotě 45 °C. Nakonec je z každé linie promývací roztok A odstraněn pipetou.

Posledním krokem reverzní hybridizace je vyvolání zbarvení proužků na stripěch. To se provádí při pokojové teplotě a za stálého promíchávání. Do každé linie se stripem se přidá 1 ml konjugátu a s ním se stripy inkubují 15 minut při pokojové teplotě. Konjugát se odstraní a přidá se 1 ml promývacího roztoku B. Proužky se promyjí, roztok se odstraní a opět se přidá 1 ml promývacího roztoku B. Nyní však s tímto roztokem proběhne inkubace po dobu 5 minut za pokojové teploty na třepačce (přibližně 50 rpm). Roztok se odstraní a opět se přidá stejné množství promývacího roztoku B, opět proběhne inkubace po dobu 5 minut za pokojové teploty. Poté, co je promývací roztok odstraněn, je ke stripům přidán 1 ml roztoku vyvíjejícího zbarvení proužků (substrátu). S tímto roztokem je nutné stripy inkubovat 15 minut při pokojové teplotě ve tmě za stálého promíchávání. Nakonec je reakce zastavena odstraněním roztoku a opláchnutím stripů v destilované vodě, stripy se nechají uschnout v temnu na savém papíře.

Vyhodnocení nabarvených stripů a určení genotypů se provádí porovnáním počtu a polohy proužků na stripu s transparentní dekodovací kartou z kitu a vyhodnocením dle interpretační tabulky v návodu výrobce (klasifikace podle Simmondse, genotypy 1a-1c, 2a-2d, 3a-3f, 4a-4k, 5a, 6a, 10a.). Kontrola kvality je pro každý vzorek monitorována kontrolními proužky na každém stripu (User manual, GEN-C Reverse Hybridization strip assay, NLM diagnostici).

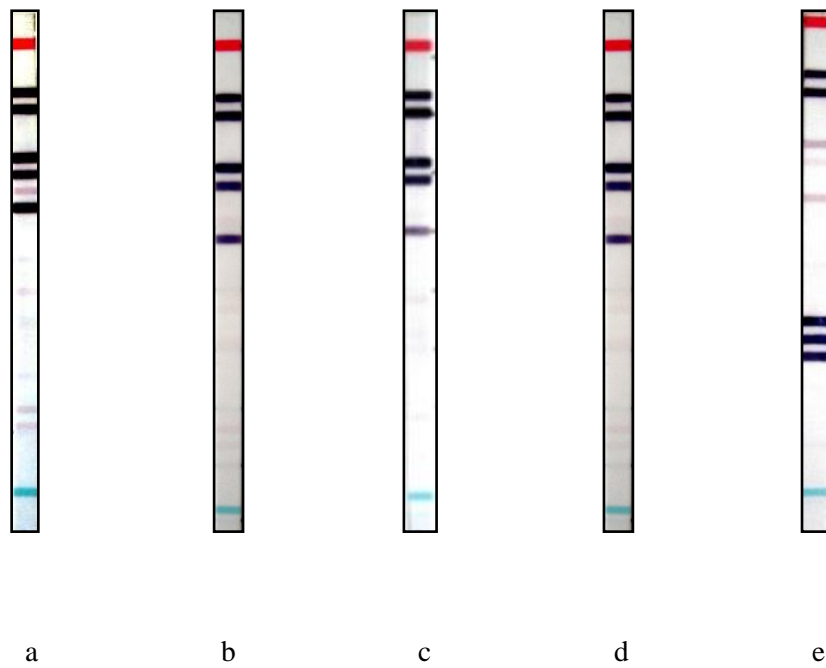
3.3 Výsledky

Po reverzní hybridizaci, která se provádí výše uvedeným způsobem na speciálních membránových proužcích s navázanými sondami, se na jednotlivých stripech zabarví ta místa, na která byly specificky navázány fragmenty virové RNA daného genotypu. Výsledné stripy, na kterých jsem metodu ověřovala, jsou zobrazeny na obrázku 4 (Obr. 4). Metoda byla ověřována na pěti stripech, které jsou v následujícím textu označovány malými písmeny a-e. Pro určení genotypů podle vzniklých barevných proužků na stripech je nejprve nutné očíslovat jednotlivé proužky, a to podle dekódovací kartičky, která je součástí soupravy pro reverzní hybridizaci a je zobrazena na obrázku 5 (Obr.5). Dekódovací kartička je průhledná a je na ní zobrazen vzor proužků, které jsou opatřeny čísly. Po přiložení stripu k této kartičce tak, aby byly v jedné linii jak červená, tak modrá značka stripu a kartičky, je možné každému proužku přiřadit číslo. Čísla přiřazená daným stripům a-e jsou zaznamenána v tabulce II (Tab. II). Poté, co jsou jednotlivým značkám přiřazena čísla podle dekódovací kartičky, se tato čísla vyhledají v interpretační tabulce. V té jsou uvedeny všechny kombinace čísel odpovídající daným genotypům. Například genotypy určené v průběhu praktické části jako 1b, se vyznačují čísly proužků 1, 2 a 5. Interpretační tabulka je zobrazena na obrázku 6 (Obr.6).

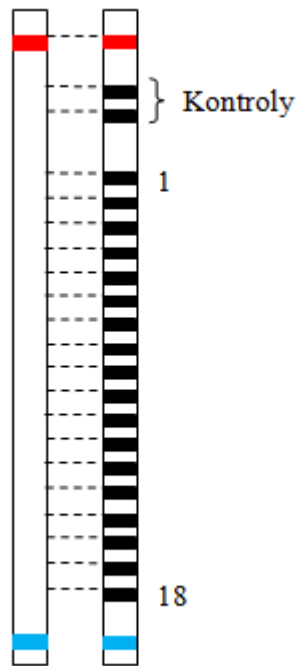
Tab. II: Čísla proužků na stripech odečtená z dekódovací kartičky po provedení reverzní hybridizace a určené genotypy podle interpretační tabulky na základě předem identifikovaných čísel proužků.

Strip	a	b	c	d	e
Čísla	1, 2, 4	1, 2, 5	1, 2, 5	1, 2, 5	11, 12, 13
Genotyp	1a	1b	1b	1b	3a

V České Republice je nejvyšší prevalence genotypu 1b, a to přibližně 75-80 %. Stejně tak většina z ověřených vzorků odpovídala právě tomuto genotypu.



*Obr. 4: Výsledné stripy se zabarvenými proužky po provedení reverzní hybridizace.
 a) genotyp 1a; b) genotyp 1b; c) genotyp 1b; d) genotyp 1b; e) genotyp 3a*



Obr. 5: Nákres dekódovací kartičky. Používá se pro očíslování proužků vzniklých v průběhu reverzní hybridizace na stripech. Do levé části se přiloží strip tak, aby si odpovídaly modré a červené značky. Ze vzoru, který je zobrazen na pravé straně, se odečtou čísla jednotlivých proužků stripu. Proužky jsou číslovány 1-18 od shora dolů.

3.4 Diskuze

Všechny kroky metody pro genotypizaci HCV (izolace, amplifikace a reverzní hybridizace) byly prováděny ručně. Metody nejsou plně automatizovány, což plyne zejména z použitého postupu, dostupného přístrojového vybavení a počtu vyšetřovaných vzorků. V průběhu praktické části nedošlo k žádným komplikacím. I když množství izolované HCV RNA nebylo nijak měřeno, důkazem úspěšné izolace patogenní RNA byla její následná amplifikace pomocí RT-PCR, která je schopna amplifikovat požadovaný fragment nukleové kyseliny již při jeho minimálním množství. Oba kroky tedy proběhly podle předpokladů. Výsledky byly porovnány se vzorky, které byly typizovány předem v běžném provozu laboratoře a ve všech případech byla pozorována shoda. Nedošlo ani ke kontaminaci vzorků mezi sebou ani ke kontaminaci z jiného externího zdroje, lze tedy tvrdit, že genotypizace byla provedena správně a přesně. Na pěti vzorcích o předem známém genotypu viru hepatitidy C byla ověřena funkčnost metody. Ta se v tomto případě jeví jako 100%, avšak v literatuře je uváděna spolehlivost přibližně 98 %, a to zejména z důvodu vysoké heterogenity viru, kterou je schopen získat velice rychle. Tato heterogenita pak nemusí být v průběhu klinických testů zaznamenána, jelikož souprava pro reverzní hybridizaci je schopna detekovat pouze některé z genotypů. Konkrétně se jedná o genotypy 1a-1c, 2a-2d, 3a-3f, 4a-4k, 5a, 6a, 10a. Za předpokladu přítomnosti jiného než výše uvedeného genotypu pak mohou testy poskytovat falešně negativní výsledky.

4 ZÁVĚR

Samotná genotypizace je nutným klinickým vyšetřením, doporučovaným odbornými autoritami zejména na počátku terapie chronické virové hepatitidy C, které by měli pacienti trpící hepatidou C podstoupit a to z důvodu rozdílných reakcí odlišných genotypů na současnou léčbu pegylovaným interferonem- α a ribavirinem. Různé genotypy reagují na léčbu jinak citlivě, z toho důvodu se na základě genotypu viru určuje jak délka léčby pacienta, tak dávka léku, která mu bude po tuto dobu podávána. Efektivita léčby však není závislá pouze na genotypu viru, který je přítomen v organismu pacienta, ale také na genové determinaci pacienta samotného. V lidském genu pro interleukin 28B se vyskytují jednonukleotidové polymorfizmy, které taktéž ovlivňují, do jaké míry bude léčba pacienta úspěšná.

5 SEZNAM LITERATURY

- Alter, M.J. (1997): Epidemiology of Hepatitis C. *Hepatology* 26: 62S-65S
- Asabe, S.I., Tanji, Y., Satoh, S., Kaneko, T., Kimura, K., Shimotohno, K. (1997): The N-terminal region of hepatitis C virus-encoded NS5A is important for NS4A-dependent phosphorylation. *Journal of Virology* 71: 790-796
- Bahrens, S.E., Tomei, L., De Francesco, R. (1996): Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *The EMBO Journal* 15: 12-22
- Barth, H., Liang, T.J., Baumert, T.F. (2006): Hepatitis C virus entry: molecular biology and clinical implications. *Hepatology* 44: 527-535
- Bartosch, B., Bukh, J., Meunier, J.C., Granier, C., Engle, R.E., Blackwelder, W.C., Emerson, S.U., Cosset, F.L., Purcell, R.H. (2003): In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100: 14199-14204
- Bellentani, S., Tiribelli, C. (2001): The spectrum of liver disease in the general population: lesson from the Dionysos study. *Journal of Hepatology* 35(4): 531-537
- Borowski, P., Oehlmann, K., Heiland, M., Laufs, R. (1997): Nonstructural protein 3 of hepatitis C virus blocks the distribution of the free catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Journal of Virology* 71: 2838-2843
- Boulestin, A., Sandres-Saune, 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-alpha. *Journal of Medical Virology* 68: 221-228
- Boyer, N., Marcellin, P. (2000): Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C. *Journal of Hepatology* 32: 98-112
- Brass, V., Bieck, E., Montserret, R., Wolk, B., Hellings, J.A., Blum, H.E., Penin, F., Moradpour, D. (2002): An amino-terminal amphipatic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 8130-8139
- Bukh, J., Miller, R.H., Purcell, R.H. (1995): Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Seminars in Liver Disease* 15: 41-63
- Bukh, J., Purcell, R.H., Miller, R.H. (1994): Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 8239-8243
- Collier, L., Oxford, J. (2006): Properties of hepatitis C virus (HCV). In: Collier, L., Oxford, J. (ed.): *Human Virology Third Edition*, pp. 169, Oxford University Press Inc., New York

- De Francesco, R., Migliaccio, G. (2005): Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature* 436: 953-960
- Ehrmann, J., Hůlek, P. (2010): Chronické hepatitidy. In: Ehrmann, J., Hůlek, P. (ed.): *Hepatologie*, pp. 391-396, Grada publishing a.s., Praha
- Elazar, M., Cheong, K.H., Liu, P., Greenberg, H.B., Rice, C.M., Glenn, J.S. (2003): Amphipatic helix-dependent localization of NS5A mediates hepatitis C virus RNA replication. *Journal of Virology* 77: 6055-6061
- El-Hage, N., Luo, G. (2003): Replication of hepatitis C virus RNA occurs in a membrane-bound replication complex containing nonstructural viral proteins and RNA. *Journal of General Virology* 84: 2761-2769
- Farci, P., Alter, H.J., Wong, D.C. (1994): Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees after antibody-mediated *in vitro* neutralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 7792-6
- Fraňková, V. (1996): RNA viry. In: Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J. (ed.): *Lékařská mikrobiologie*, pp. 450-466, Marvil, Praha
- Gallinari, P., Brennan, D., Nardi, C., Brunetti, M., Tomei, L., Steinkuhler, C., De Francesco, R. (1998): Multiple enzymatic activities associated with recombinant NS3 protein od hepatitis C virus. *Journal of Virology* 72: 6758-6769
- Goffard, A., Callens, N., Bartosch, B., Wychowski, C., Cosset, F.L., Montpellier, C., Dubuisson, J. (2005): Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Journal of Virology* 79: 8400-8409
- Gonzales-Peralta, R.P., Davis, G.L., Lau, J.Y. (1992): Pathogenetic mechanisms of hepatocellular damage in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology* 21: 255-9
- Grakoui, A., McCourt, D.W., Wychowski, C., Feinstone, S.M., Rice, C.M. (1993): a sekond hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 10583-10587
- Griffin, S.D., Beales, L.P., Clarke, D.S., Worsfold, O., Evans, S.D., Jaeger, J., Harris, M.P., Rowlands, D.J. (2003): The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Letters* 535: 34-38
- Helle, F., Debusson, J. (2008): Hepatitis C virus entry into host cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65: 100-112
- Hijikata, M., Kato, N., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Ohkoshi, S., Shimotohno, K. (1991): Hypervariable regions in the putative glycoprotein of hepatitis C virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 175: 220-8
- Hnatyszyn, H.J. (2005) Chronic hepatitis C and genotyping: the clinical significance of determining HCV genotypes. *Antiviral therapy* 10: 1-11

- Hope, R.G., Murphy, D.J., McLauchlan, J. (2002): The domains required to direct core protein of hepatitis C virus and GB virus-B to lipid droplets share common features with plant oleosin proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 4261-4270
- Chavaliez, S. (2011): Virological tools to diagnose and monitor hepatitis C virus infection. *Clinical Microbiology and Infection* 17: 116-121
- Irving, W.L. (2002): The role of the virology laboratory in the management of hepatitis C virus infection. *Journal of Clinical Virology* 25: 3-13
- Kaito, M., Ishida, S., Tanaka, H., Horiike, S., Fujita, N., Adachi, Y., Kohara, M., Konishi, M., Watanabe, S. (2006): Morphology of hepatitis C and hepatitis B virus particles as detected by immunogold electron microscopy. *Medical Molecular Morphology* 39: 63-71
- Kim, J.L., Morgenstern, K.A., Lin, C., Fox, T., Dwyer, M.D., Landro, J.A., Chambers, S.P., Markland, W., Lepre, C.A., O'Malley, E.T., Harbeson, S.L., Rice, C.M., Murcko, M.A., Caron, P.R., Thomson, J.A. (1996): Crystal structure of hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell* 87: 343-355
- Lerat, H., Berby, F., Trabaud, M.A., Vidalin, O., Major, M., Trépo, C., Inchauspé, G. (1996): Specific detection of hepatitis C minus strand RNA in hematopoietic cells. *Journal of Clinical Investigation* 97: 845-51
- Lerat, H., Honda, M., Beard, M.R., Loesch, K., Sun, J., Yang, Y., Okuda, M., Gosert, R., Xiao, S.Y., Weinman, S.A., Lemon, S.M. (2002): Steatosis and liver cancer in transgenic mice expressing the structural and nonstructural protein of hepatitis C virus. *Gastroenterology* 122: 352-365
- Levin, M.K., Gurjar, M., Patel, S.S. (2005): A Brownian motor mechanism of translocation and strand separation by hepatitis C virus helicase. *Nature Structural & Molecular Biology* 12: 429-435
- Lundin, M., Lindstrom, H., Gronwall, C., Persson, M.A. (2006): Dual topology of the processed hepatitis C virus protein NS4B is influenced by the NS5A protein. *Journal of General Virology* 87: 3263-3272
- Macdonald, A., Crowder, K., Street, A., McCormick, C., Harris, M. (2004): The hepatitis C virus NS5A protein binds to members of the Src family of tyrosine kinases and regulates kinase activity. *Journal of General Virology* 85: 721-729
- Marcellin, P., Martinot-Peignoux, M., Elias, A., Branger, M., Courtois, F., Level, R., Erlinger, S., Benhamou, J.P. (1994): Hepatitis C virus (HCV) viremia in human immunodeficiency virus-seronegative and virus-seropositive patients with indeterminate HCV recombinant immunoblot assay. *The Journal of Infectious Diseases* 170: 433-5

- Neumann, A.U., Lam, N.P., Dahari, H., Gretch, D.R., Wiley, T.E., Layden, T.J., Perelson, A.S. (1998): Hepatitis C viral dynamics *in vivo* and the antiviral efficacy of interferon- α therapy. *Science* 282: 103-7
- Pantůček, R., Doškař, J. (2005): Amplifikace nukleových kyselin. In: Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžicková, V., Koptíková, J.: *Metody molekulární biologie*, pp. 73 - 91, Masarykova univerzita, Brno.
- Pawlotsky, J-M. (2002): Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology* 36 (5 suppl 1): S65-S73
- Penin, F., Brass, V., Appel, N., Ramboarina, S., Montserret, R., Ficheux, D., Blum, H.E., Bartenschlager, R., Moradpour, D. (2004): Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 40835-40843
- Pietschmann, T., Kaul, A., Koutsoudakis, G., Shavinskaya, A., Kallis, S., Steinmann, E., Abid, K., Negro, F., Dreux, M., Cosset, F.L., Bartenschlager, R. (2006): Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103: 7408-7413
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A.J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., Abrignani, S. (1998): Binding of Hepatitis C virus to CD81. *Science* 282: 938-41
- Polyak, S.J., McArdle, S., Liu, S.L., Sullivan, D.G., Chung, M., Hofgartner, W.T., Carithers, Jr. R.L., McMahon, B.J., Mullins, J.I., Corey, L., Gretch, D.R. (1998): Evolution of hepatitis C virus quasispecies in hypervariable region 1 and the putative interferon sensitivity-determining region during interferon therapy and natural infection. *Journal of Virology* 72: 4288-4296
- Puoti, M., Zonaro, A., Ravaggi, A., Marin, M.G., Castelnovo, F., Cariani, E. (1992): Hepatitis C Virus RNA and antibody response in the clinical course of acute hepatitis C infection. *Hepatology* 16: 877-81
- Reed, K.E., Grakoui, A., Rice, C.M. (1995): Hepatitis C virus-encoded NS2-3 protease: cleavage-site mutagenesis and requirements for bimolecular cleavage. *Journal of Virology* 69: 4127-4136
- Reed, K.E., Xu, J., Rice, C.M. (1995): Phosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein *in vitro* and *in vivo*: properties of the NS5A-associated kinase. *Journal of Virology* 71: 7187-7197

- Robertson, B., Myers, G., Howard, C., Brettin, T., Bukh, J., Gaschen, B., Gojobori, T., Maertens, G., Mizokami, M., Nainan, O., Netesov, S., Nishioka, K., Shin-i, T., Simmonds, P., Smith, D., Stuyver, L., Weiner, A.J. (1998): Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. *Archives of Virology* 143: 2493-2503
- Růžičková, V. (2005): Metody molekulární virologie. In: Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J.: *Metody molekulární biologie*, pp. 151-152, Masarykova univerzita, Brno.
- Sarin, S.K., Kumar, M. (2012): Natural history of HCV infection. *Hepatology International* 6: 684-695
- Serebov, V., Pyle, A.M. (2004): Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase. *Nature* 430: 476-480
- Shimizu, Y.K., Hijikata, M., Iwamoto, A., Alter, H.J., Purcell, R.H., Yoshikura, H. (1994): Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant viruses. *Journal of Virology* 68: 1494-500
- Simmonds, P., Bukh, J., Combet, Ch., Deléage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspé, G., Kuiken, C., Maertens, G., Mizokami, M., Murphy, D.G., Okamoto, H., Pawlotsky, J-M., Penin, F., Sablon, E., Shin-I, T., Stuyver, L.J., Thiel, H-J., Viazov, S., Weiner, A.J., Widell, A. (2005): Consensus Proposals for a Unified System of Nomenclature of Hepatitis C Virus Genotypes. *Hepatology* 42: 962-973
- Simmonds, P., Smith, D.B., McOmish, F., Yap, P.L., Kolberg, J., Urdea, M.S., Holmes, E.C. (1994): Identification of genotype sof hepatitis C virus by sequence comparisons inthe core, E1 and NS-5 regions. *Journal of General Virology* 75: 1053-1061
- Smith, D.B., Mellor, J., Jarvis, L.M., Davidson, F., Kolberg, J., Urdea, M., Yap, P.L., Simmonds, P. (1995): Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing. *Journal of General Virology* 76: 1749-1761
- Steinman, E., Penin, F., Kallis, S., Patel, A.H., Bartenschlager, R., Pietschmann, T. (2007): Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLOS Pathogens* 3: e103
- Stránský, J. (1999): Původce a vyšetřovací metody. In: Stránský, J. (ed.): *Virová hepatitida C*, pp. 14-23, Grada Publishing, Praha
- Thimme, R., Oldach, D., Chang, K.M., Steiger, C., Ray, S.C., Chisari, F.V. (2001): Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *The Journal of Experimental Medicine* 194(10): 1395-1406
- Turner, C., Witwer, C., Hofacker, I.L., Stadler, P.F. (2004): Conserved RNA secondary structures in *Flaviviridae* genomes. *Journal of General Virology* 85: 1113-24

- Tokita, H., Okamoto, H., Tsuda, F., Song, P., Nakata, S., Chosa, T., Iizuka, H., Mishiro, S., Miyakawa, Y., Mayumi, M. (1994): Hepatitis C virus variants from Vietnam are classifiable into the seventh, eighth, and ninth major genetic groups. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 91: 11022-11026
- Urbánek, P., Husa, P. (2010): Virová hepatitida C. In: Ehrmann, J., Hůlek, P. (ed.): *Hepatologie*, pp. 239-241, Grada Publishing, Praha
- Votava, M. (2003): Obalené RNA viry. In: Votava, M. (ed.): *Lékařská mikrobiologie speciální*, pp. 290-196, Neptun, Brno
- Weiner, A.J., Brauer, M.J., Rosenblatt, J., Richman, K.H., Tung, J., Crawford, K., Bonino, F., Saracco, G., Choo, Q-L., Houghton, M., Han, J.H. (1991): Variable and hypervariable domains are found in the region of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 180: 842-848
- Wolk, B., Sansonno, D., Krausslich, H.G., Dammaco, F., Rice, C.M., Blum, H.E., Moradpour, D. (2000): Subcellular localization, stability and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *Journal of Virology* 74: 2293-2304
- NLM diagnostici (2011): RT-PCR mix for GEN-C kit (AC004)[®]. Cat. No. NLM 6080, pp. 5-8
- NLM diagnostici (2011): GEN-C (Reverse Hybridization Strip Assay)[®]. Cat. No. NLM 6130, pp. 7-14
- GeneProof: PathogenFree RNA Isolation Kit[®]. Cat. No. IRNA050, pp. 3-10

5.1 Seznam hypertextových odkazů

STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV

URL: < <http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-1998-2007-absolute> > [cit. 2013-1-22]

WORLD HEALTH ORGANIZATION

URL: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/index.html> > [cit. 2013-4-13]

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ALT	Alanin aminotransferáza
Anti-HCV	Protilátky proti HCV
cDNA	Komplementární DNA
CTL	Cytotoxické T-lymfocyty
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTP	Deoxynukleotidtrifosfát
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etylendiamin tetraoctová kyselina
EIA	Enzymová imunoanalýza
ER	Endoplazmatické retikulum
GAG	Glykosaminoglykany
GTC	Guanidin thiokyanát
HCV RNA	Ribonukleová kyselina viru hepatitidy C
HCV	Virus hepatitidy C (Hepatitis C Virus)
HEPES	kyselina 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperaziny] ethansulfonová
HIV	Virus lidské imunitní nedostatečnosti
HVR	Hypervariabilní oblast
IL	Interleukin
IRES	Místo pro vazbu ribozomu
kb	Kilobáze
LDL	Low-density lipoproteins
MAPK	Mitogenem aktivované proteinkinázy
mRNA	Mediátorová RNA
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PKA	Proteinkináza A
RNA	Ribonukleová kyselina
RNáza	Ribonukleáza
RT	Reverzní transkripce
RT-PCR	Polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí
Th	Pomocné T-lymfocyty
TMD	Transmembránové domény

Tris	tris(hydroxymetyl)aminometan
UTR	Nepřekládaná oblast genomu