



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Porovnání konfirmačního ELISA a recomLine testu pro stanovení hepatitidy C

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: [Specializace ve zdravotnictví](#)

Autor: Marcela Bačková

Vedoucí práce: MVDr. Michaela Verčinská

České Budějovice 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou/diplomovou práci s názvem „*Porovnání konfirmačního ELISA a recomLine testu pro stanovení hepatitidy C*“ jsem vypracovala 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/diplomové práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské/diplomové práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 4.5.2021

.....

podpis

Poděkování

Ráda bych touthle cestou poděkovala mé vedoucí práce MVDr. Michaelle Verčinské, za pomoc při výběru tématu práce a cenné rady při zpracování. Také bych chtěla moc poděkovat celé své rodině a blízkým za podporu nejen při studiu.

Obsah

1.	Úvod	5
2.	Hepatitida C	6
2.1.	Virus hepatitidy C	7
2.2.	Genotyp a subtyp viru hepatitidy C	8
2.3.	Výskyt virové hepatitidy C ve světě	9
2.4.	Výskyt virové hepatitidy C v České republice.....	9
2.5.	Přenos virové hepatitidy C	9
2.6.	Stádia virové infekce.....	10
	2.6.1. <i>Akutní hepatitidy C</i>	11
	2.6.2. <i>Chronická hepatitida C</i>	11
2.7.	Laboratorní diagnostika VHC.....	12
	2.7.1. <i>Sérologické metody</i>	13
	2.7.2. <i>Molekulárně – diagnostické vyšetření HCV RNA pomocí PCR</i>	16
2.8.	Léčba.....	16
3.	Cíle práce a hypotézy	18
4.	Metodika	19
4.1.	Stanovení protilátek anti-HCV na analyzátoru Architect i2000SR	23
4.2.	Konfirmační test.....	30
	4.2.1. <i>Konfirmační test pro ověření pozitivity anti-HCV metodou ELISA</i> 31	
	4.2.2. <i>Konfirmační test pro ověření IgG protilátek pozitivity HCV metodou immunoassay</i>	37
5.	Výsledky.....	43
5.1.	Výsledky confirmace pomocí ELISA.....	43
5.2.	Výsledky konfirmačního stanovení pomocí recomLine	46
6.	Diskuze	48
7.	Závěr	50

8.	Literatura.....	54
9.	Seznam obrázků	57
9.1.	Seznam obrázků	57
9.2.	Seznam tabulek	58
10.	Seznam zkratek	59

Porovnání konfirmačního ELISA a recomLine testu pro stanovení hepatitidy C

Abstrakt

Má bakalářská práce se zabývá onemocněním hepatitidy C a jeho laboratorní diagnostikou, zejména potom konfirmačními testy. Teoretická část se zaměřuje na nemoc obecně, popisuje virus hepatitidy C, který nemoc způsobuje. Dále rozebírá akutní a chronickou fázi, přenos viru a možnosti léčby.

V praktické části popisují vyšetření screeningových protilátek anti-HCV a jak se postupuje v případě nálezu. Hlavním úkolem mé praktické části je porovnání dvou konfirmačních testů – ELISA a imunoblotu recomLine.

Na konci práce oba testy hodnotím a porovnávám konečné výsledky.

Klíčová slova

Hepatitida C, Virus hepatitidy C, CMIA, ELISA, imunoblot

Comparison confirmation ELISA to recomLine test for the determination of hepatitis C

Abstract

My bachelor thesis deals with hepatitis C disease and its laboratory diagnosis, especially confirmatory tests. The theoretical part focuses on the disease in general, describes the hepatitis C virus that causes the disease. It also discusses the acute and chronic phases, virus transmission and treatment options.

In the practical part I describe the examination of anti-HCV screening antibodies and how to proceed in case of a positive finding. The main task of my practical part is to compare two confirmatory tests - ELISA and immunoblot recomLine.

At the end of the work I evaluate both tests and compare the final results.

Key words

Hepatitis C, Virus hepatitis C, CMIA, ELISA, immunoblot

1. Úvod

Hepatitidy můžeme dělit dle délky trvání na akutní a chronické formy. Akutní virové hepatitidy patří k nejčastějším jaterním onemocněním po celém světě a vedou přibližně k 1–2 milionům úmrtím ročně. K přechodu do chronicity dochází po 6 -ti měsících od expozice, to později může způsobit jaterní cirhózu a vést až k vzniku hepatocelulárního karcinomu.

Játra jsou největší lidská žláza, skládající se z pravého a levého laloku. Laloky se skládají z malých lalůčku, které tvoří jaterní buňky = hepatocyty. Játra mají nespočetně mnoho funkcí a jsou života důležitým orgánem. Jejich hlavní funkcí je vstřebávání živin, odstraňují škodlivé látky z těla nebo regulují hladinu mnoha hormonů a vitamínů.

Virové hepatitidy jsou obecně zánětlivá – nekrotická onemocnění poškozující jaterní parenchym. Ve většině případech jsou způsobena tzv. primárně – hepatotropními (=játra – napadajícími) viry. Rozlišujeme typů virů, které způsobují virovou hepatitidu, označovaných písmeny A, B, C, D, E a G. Infekce HCV je nejčastější příčinou jaterních onemocnění především ve vyspělých zemích světa, a to i kvůli absenci účinné vakcíny.

2. Hepatitida C

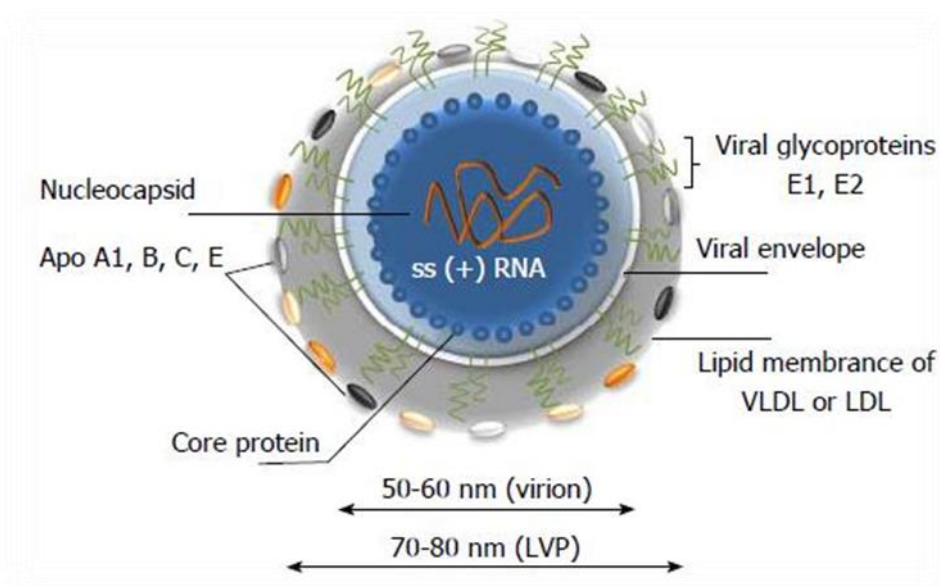
Virová hepatitida C (HCV) je zánětlivé – nekrotické onemocnění jater, které způsobuje virus hepatitidy C (VHC). Fáze akutní je velmi často asymptomatická nebo se objevují nespecifické extrahepatální příznaky, jako jsou horečka, únava, náhlý úbytek váhy nebo nauzea. Tyto příznaky mohou přetrvávat i několik let a pacient je v období velmi infekční, a to i v případě, kdy nemá žádné příznaky. Nespecifické příznaky způsobují úskalí včasné diagnostice, a proto bývá nemoc odhalena až v pozdější – chronické fázi. K přechodu do chronické fáze dochází u více než 80 % osob. Největší hrozbu v chronické formě představuje přechod v jaterní cirhózu a následně vznik hepatocelulárního karcinomu. Objevení jaterní fibrózy (zvětšení jater) progradující do cirhózy bývá prvním ukazatelem na tuto nemoc, kdy k odhalení dochází většinou náhodně při preventivním či jiném vyšetření. (Krekulová, Praha 1998).

K poškození organismu následkem viru dochází nejspíše kombinací dvou způsobů – přímým účinkem (tzv. cytopatickým efektem), kdy dochází k poškození hepatocytů a přímým poškozením (tzv. cytolytickým efektem) zprostředkovaného činností vlastního imunitního systému pacienta. (Navrátil, 2017)

Bylo zjištěno, že nemoc postihuje muže zhruba dvakrát více než ženy, a to především homosexuální, či bisexuální muže ve věku od 15–39 let.

2.1. Virus hepatitidy C

Virus hepatitidy C (HCV) byl objeven v roce 1989 vědcem Michaelem Houghtonem, který později za tento objev obdržel Laskerovu cenu za klinický lékařský výzkum. Jedná se o malý (velikost 50–80 nm) obalený RNA (tvořen ribonukleovou kyselinou) virus z čeledi Flaviviridae, a je jediný zástupce rodu Hepaciviru. (Husa, 2005)



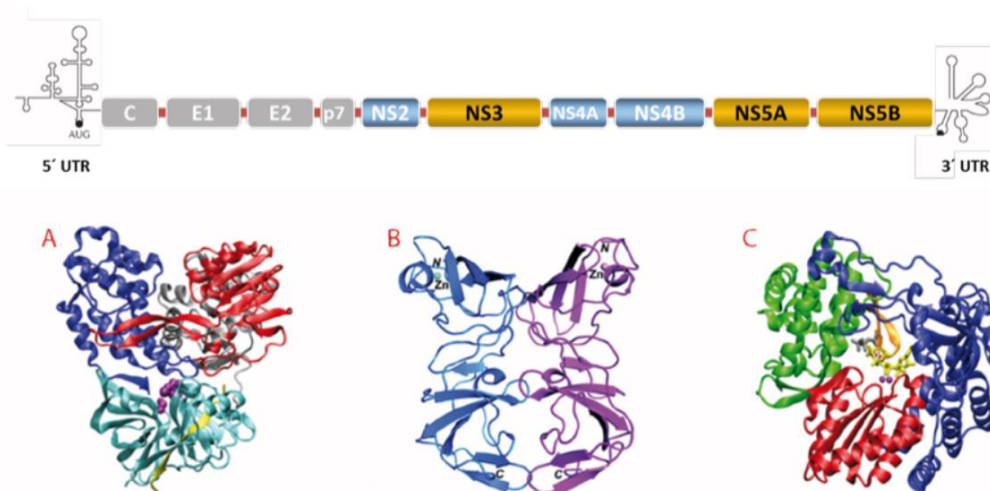
Obrázek 1. Virus HCV (Mozorov, 2018)

HCV má velmi dynamický proces života s poločasem pouze několik hodin, za to ale s produkcí 1012 virových částic denně. (Špičák, 2017)

Virus je tvořen jednovláknovou pozitivní RNA (ribonukleová kyselina). Jeho genom se skládá z 9 379 nukleotidů a jednoho dlouhého čtecího otevřeného rámce (open reading frame = ORF), který syntetizuje zhruba 3 010 aminokyselin (AMK). Dále je meziproduct

štěpen na 3 strukturální proteiny: dva obalené (envelope) glykoproteiny E1 a E2, nukleokapsidový protein (core-C) a několik nestructurních proteinů (NS1 – NS5). Řada nestructurních proteinů hraje důležitou roli při množení viru.

(Ehrmann a Můlek, 2010 Praha)



Obrázek 2. Organizace genomu HCV (nahore) a struktura jednotlivých proteinů (dole) (Špičák)

2.2. Genotyp a subtyp viru hepatitidy C

Charakteristickou vlastností viru je extrémní heterogenita, a proto vědci stále hledají účinnou vakcínu. RNA viry totiž často mutují a vyvíjí se v různé genotypy, subtypy a kvadruhy. V současné době je známo 7 různých genotypů (značených 1-7) a více než 50 subtypů značených malými písmeny abecedy. Výskyt se liší geograficky. Jednotlivé genotypy se navzájem liší v 30–35 % nukleotidových sekvencích. Subtypy se od sebe liší zhruba v 20–25 %. V Evropě je nejrozšířenější varianta viru 1b.

V České republice je prevalence tohoto genotypu 75–80 %. V Evropě (včetně ČR) dochází však k nárůstu zastoupení genotypu 3. (Ehrmann, Můlek, Praha 2010)

2.3. Výskyt virové hepatitidy C ve světě

Infekce HCV se vyskytuje celosvětově a ve 21. století postihuje asi 170–200 milionů osob, přičemž 71 milionů z toho trpí chronickou formou HCV. Prevalence v celkové běžné populaci tvoří průměrně 2,8 %. V USA žije přibližně 4 miliony (1,7 %) nemocných pacientů trpících HCV infekcí. V Evropě postihuje nemoc 5 milionů (1 %) lidí. Infekce se vyskytuje nejčastěji v rozvojových zemích, jako je Afrika, jižní Amerika nebo jihovýchodní Asie.

2.4. Výskyt virové hepatitidy C v České republice

Séro – prevalenční studie z roku 2015 dokazuje, že v České republice je nakaženo HCV přes 80 tisíc lidí a většina z nich o nákaze nemá ani tušení, procentuálně to činí 1,67 % populace z celkově nakažených, z toho 0,93 % chronickou formou HCV. Nejvíce infikovaných osob je v rizikových skupinách, jakou jsou – např. intravenózní uživatelé drog, vězni nebo lidé ze sociálně – slabších skupin. Ročně se v ČR diagnostikuje kolem 800 – 1 000 nových případů.

(Urbánek, 2019)

2.5. Přenos virové hepatitidy C

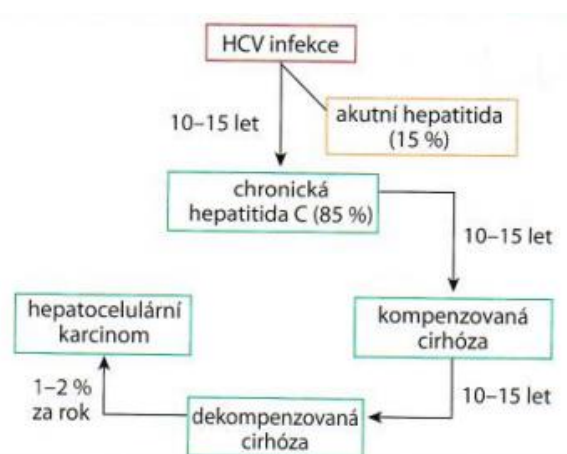
HCV infikuje výhradně člověka a bylo zjištěno, že se může objevit také u šimpanzů. Inkubační doba nemoci je značně variabilní, většinou od 2-26 týdnů od expozice. Přenos je nejčastější parenterální tj. expozicí infikované krve nebo jiných tělesných tekutin. K testování dárců se přistoupilo v roce 1992, po objevu viru HCV. Před zavedením povinného testování se mohlo stát, že řada pacientů se nakazila při transfúzi či transplantaci. Je také možné, že u některých z nich se nemoc zatím neprojevila nebo v některých vzácných případech vymizela sama díky obraně imunitního systému. (Lobovská, 2001)

K přenosu dochází nejčastěji

- u intravenózních uživatelů drog pomocí infikované stříkačky
- pohlavním stykem (hlavně u promiskuitních osob)
- z matky na dítě při porodu
- při provedení tetování nebo piercingu v nesterilním prostředí
- před rokem 1992 transfúzí krve nebo krevních derivátů
- před rokem 1992 hemodialýzou či transplantací orgánů

2.6. Stádia virové infekce

Rozlišujeme dvě formy virové hepatitidy C: akutní a chronickou. Chronická hepatitida C způsobuje nejčastější příčinu jaterního onemocnění ve vyspělých zemích. Přejít infekce do chronicity je v rozmezí od 40–90 % v závislosti na věku, virové náloži a řadě dalších faktorů. Nebezpečí přechodu do chronicity je mnohem vyšší u starších osob. V současné době neexistuje žádný specifický test, kterým bychom byli schopni rozlišit akutní a chronickou hepatitidu.



Obrázek 3. Následky infekce virem hepatitidy C (Chapel, 2018)

2.6.1. Akutní hepatitidy C

Akutní hepatitida C je diagnostikována velmi vzácně, více než $\frac{3}{4}$ pacientů o své nemoci nemá ani tušení. Raritně známý ikterický průběh je také velmi vzácný, objevuje se nanejvýše u 20 % pacientů. Ještě více vzácný je fulminantní průběh akutní hepatitidy C, ten se dostavuje při koinfekci s HBV (virová hepatitida B) či HIV (virus lidské imunitní nedostatečnosti), kterou nacházíme typicky v rizikových skupinách (např. narkomani). (Husa, 2005) U akutní virové hepatitidy C je typický laboratorní nález, a to i v případě absence klinických příznaků, zvýšeného sérového ALT (až 30 –ti násobně) (Ehrmann, 2010)

2.6.2. Chronická hepatitida C

V diagnostice se setkáváme daleko častěji s chronickou formou HCV. Pokud nedojde k eliminaci viru do 4-6 měsíců od expozice, přechází nemoc do chronicity. Řadíme sem však i případy, u kterých je okamžik přenosu neznámý. Klinické příznaky chronické hepatitidy C jsou velmi často nespecifické a odhaleny bývají náhodně při jiném vyšetření. (Ehrmann, 2010).

Neléčená chronická hepatitida C vede k progredující přestavbě jaterního parenchymu s rizikem vzniku hepatocelulárního karcinomu (HCC) (4–10%). Zhruba třetina transplantací jater se provádí u pacientů s chronickou hepatitidou C. Zároveň je však chronická hepatitida C jedinou chronickou virovou infekcí, která je v současné době již vyléčitelná.

Virologické faktory	Hostitelské faktory	Faktory zevního prostředí
<ul style="list-style-type: none"> • viremie • virové kvazidruhy • genotyp 	<ul style="list-style-type: none"> • věk v okamžiku expozice • pohlaví • rasa • koinfekce: <ul style="list-style-type: none"> – HBV – HIV • komorbidita: <ul style="list-style-type: none"> – hemochromatóza – NASH – schistosomiáza • genetické faktory: <ul style="list-style-type: none"> – HLA II. třídy • exprese nemoci: <ul style="list-style-type: none"> – normální ALT 	<ul style="list-style-type: none"> • alkohol • kouření • kontaminace zevního prostředí

Obrázek 4. Faktory, které by mohly mít vliv na progresi jaterního postižení při chronické infekci HCV (Ehrmann)

2.7. Laboratorní diagnostika VHC

Vyšetřovací metody k detekci infekce HCV rozdělujeme na:

Sérologické metody

Molekulárně – diagnostické metody

2.7.1. Sérologické metody

Stále zůstává jedním z nejdůležitějších metod pro stanovení protilátek anti-HCV. V současné době se používají metody 3. generace – EIA (enzyme immunoassay) a jejich varianty. Jejich senzitivita a specifita se pohybuje od 97–99 %. Protilátky jsou markery expozice s virem hepatitidy a je třeba mít na paměti, že nejsou nositelem imunity organismu, tudíž nemají neutralizační efekt a během života může dojít ke koinfekci. (Urbánek, 2019)

Sérologické metody dále dělíme na:

- **Přímé** – detekujeme přítomnost HCV-core Ag (antigenu), jehož stanovení výrazně redukuje tzv. diagnostické okno
- **Nepřímé** – detekujeme přítomnost specifických protilátek anti-HCV, které jsou markerem expozice daného pacienta s virem hepatitidy C (zhruba po 70 dnech od expozice)

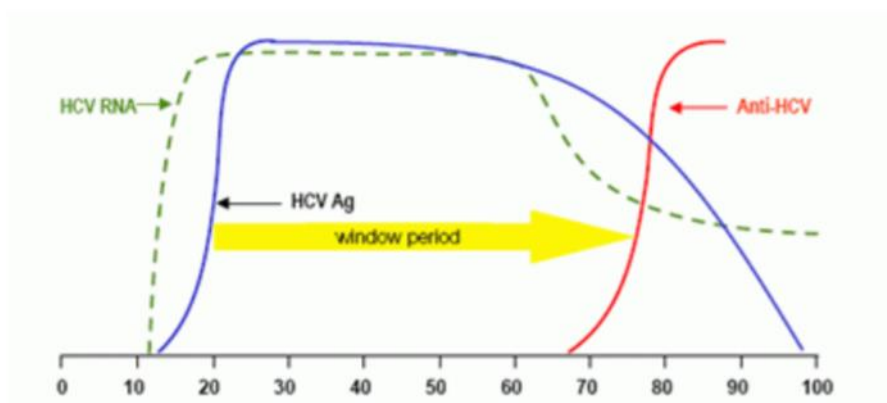
2.7.1.1. Stanovení přítomnosti antigenu HCV-core

Toto vyšetření lze provádět metodou CMIA (chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročásticích) na přístroji Architect od firmy ABBOTT, který má senzitivitu 97 % a specifitu ještě vyšší, kolem 99 %. Vyšetření antigenu HCV-core a zároveň stanovení anti-HCV protilátek nelze provádět na jednom stejném přístroji Architect, kvůli možnosti vzniku komplexu Ag x Ab (antigen x protilátka).

2.7.1.2. Detekce specifických protilátek anti-HCV

Protilátky anti – HCV jsou přítomné u naprosté většiny pacientů infikovaných virem hepatitidy C. Výjimkou jsou pacienti, kteří jsou testováni brzy po expozici virem, jedná se o tzv. diagnostické okno. Nutno podotknout, že anti-HCV nemají neutralizační efekt, protože nejsou nositelem imunitní odpovědi, tudíž může dojít k reinfekci. Protilátky u pacienta přetrvávají celoživotně, proto vyšetřením nelze rozlišit akutní stadium od chronického, ani již vyléčeného pacienta. Vyšetření se používá při stanovení diagnózy infekce hepatitidy C a jako screeningový test k prevenci přenosu viru hepatitidy C (HCV) na příjemce krve, krevních komponentů, buněk, tkání a orgánů. (Hůlek, Praha 2018)

Vyšetření protilátek anti-HCV provádíme taktéž metodou CMIA (chemiluminiscenční imunoanalýzou na mikročasticích) na analyzátoru Architect od společnosti ABBOTT.



Obrázek 5. Zobrazení průběhu infekce od expozice na počet dní (100) (abbotdiagnostics)

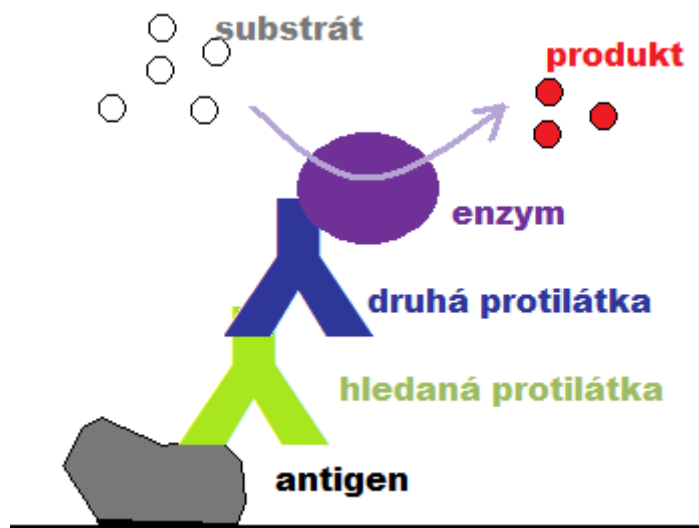
2.7.1.3. Konfirmace pomocí imunoblotu

Metoda používaná pro kvalitativní nebo semikvantitativní detekci určitého proteinu ve vzorku. Identifikujeme díky ní specifické antigeny rozpoznané polyklonálními nebo monoklonálními protilátkami. (Navrátil, Praha 2017)

2.7.1.4. Konfirmace pomocí metody ELISA

Analytický – sérologická metoda určena ke kvantitativnímu stanovení protilátek při virových infekcích hlavně i virové hepatitidy. Velkou výhodou je rychlost zpracování, vysokou senzitivitu a specifitu. Antigen (protilátka) je ukotven na nerozpustném nosiči (mikrotitrační destička). Metoda je založena na vysoké specifitě antigenu a protilátky, přičemž na jeden z těchto partnerů je navázán kovalentní vazbou enzym. Tento enzym katalyzuje přeměnu substrátu, který je přidán do směsi, na barevný produkt. Konečný produkt je měřen spektrofotometricky pomocí readeru. Koncentrace produktu je přímo úměrná množství protilátky (produktu) ve vzorku.

(Dastych. 2015)



Obrázek 6. Schéma ELISA metody (Bína P.)

2.7.2. Molekulárně – diagnostické vyšetření HCV RNA pomocí PCR

Prokazuje přítomnost virové nukleové kyseliny (HCV RNA) v séru pacienta. Vyšetření HCV RNA se provádí ze séra pomocí metody PCR (polymerázová řetězová reakce) s dolním limitem detekce ≤ 15 IU/ml. Součástí molekulárně – genetického vyšetření by mělo být i stanovení genotypu a subtypu HCV, pro správné zvolení léčebných postupů. (Urbánek, Praha 2019)

2.8. Léčba

V posledních 5-ti letech došlo k velmi dramatickému průlomů v léčbě hepatitidy C. Je však velmi důležité u pozitivních pacientů provést vyšetření na přítomnost HCV RNA pomocí PCR-RT (polymerázové řetězové reakce v reálném čase).

Vyšetření pomocí metody PCR je také nezbytné pro nastavení správné léčby pro pacienta. Při správném nastavení léčby je prognóza velmi dobrá.

Budoucnost léčby spočívá v krátkodobých kombinačních režimech několika specifických inhibitorů virové replikace.

Standartní léčba do roku 2012 bylo pomocí pegylovaného interferonu alfa (PEG-IFN) s ribavirinem (RBV), která fungovala zejména u pacientů s 2 a 3 typem, u pacientů s genotypem 1 byla úspěšnost okolo 50 %. Jednalo se o léčbu nespecifickou, která stimulovala imunitní systém. Interferon se podával jednou týdně injekčně pod kůži. Léčba trvala 25 týdnů. Měla řadu nežádoucích účinků, jako je padání vlasů, horečka, nevolnost nebo např. nechutenství. (Chapel, Praha 2018)

Od roku 2018 jsou doporučovány a preferovány tzv. DAA-přímo působící antivirotika, které jsou vysoce účinné, bezpečné a výborně tolerované prakticky u všech pacientů. Přímo působící antivirotika přímo inhibují některý z enzymů uplatňujících se v průběhu replikačního cyklu HCV. V rámci replikace HCV dochází k syntéze jediného prekurzorového proteinu, který je translačním produktem celého virového genomu. Jeho následné štěpení zahajuje virová proteáza, která postupně uvolňuje jednotlivé strukturální i nestrukturální proteiny. Posledním krokem procesu je uvolnění RNA polymerázy, která je klíčovým enzymem celé replikace. DAA jsou látky inhibující nejčastěji buď právě proteázu (produkt NS3/4 oblasti virového genomu), či RNA polymerázu (produkt NS5B).

Obrovskou výhodou je také to, že léčbu mohou podstoupit i dříve neúspěšně léčení pacienti. Léčba nemá téměř žádné vedlejší účinky. Objevem DAA se léčba zrychlila, zefektivnila a výrazně se snížily vedlejší účinky. Pacient užívá jednu tabletu denně na rozdíl od předchozí bolestivé injekce s řadou vedlejších účinků. Délka trvání léčby je 12 týdnů.

„Prvními preparáty skupiny DAA, které se dostaly do běžné praxe, byly boceprevir a telaprevir. Boceprevir a telaprevir představují první generaci virostatik, nebo také tzv. „první vlnu první generace“. Používají se pouze a zásadně v kombinaci s pegylovaným interferonem a ribavirinem. Tato první virostatika mají účinek pouze u HCV genotypu 1, u ostatních genotypů mají efekt buď nulový, nebo velice slabý s vysokým rizikem vzniku virologické rezistence. Jejich účinnost v trojkombinaci s pegylovaným interferonem a ribavirinem se u genotypu HCV 1 pohybuje kolem 65-70 %.“ (Urbánek, 2019 Praha)

3. Cíle práce a hypotézy

Cílem mé bakalářské práce bylo podrobněji se seznámit s onemocněním virové hepatitidy C a úkolem bylo zjistit, jak probíhá diagnostika protilátek anti – HCV metodou chemiluminiscenční imunoanalýzou na mikročasticích pomocí přístroje ARCHITECT i2000_{SR} od firmy ABBOTT.

Dále jsem se zabývala vzorky, které byly pomocí přístroje ARCHITECT i2000_{SR} změřeny jako pozitivní a po konzultaci vysokoškolského odborného pracovníka s lékařem bylo dohodnuto tyto vzorky vyšetřit pomocí konfirmačních testů, v mém případě jsem měla možnost zkusit použít konfirmační test metodou ELISA od firmy DIA.PRO a konfirmační test recomLine od firmy Mikrogen Diagnostik.

Vše jsem jsi prakticky vyzkoušela na vzorcích z oddělení infekční sérologie a imunologie v laboratoři Brno, SYNLAB s.r.o.

První hypotézou je, že konfirmační metoda ELISA je přesnější než metoda recomLine.

Druhou hypotézou zjišťuji, zda je recomLine vhodnější pro praxi než ELISA.

Za třetí v praxi vyzkouším, jestli je imunoblot recomLine rychlejší než ELISA. Hypotézou je, že výsledky jsou totožné.

4. Metodika

V praktické části vyzkouším práci s analyzátozem ARCHITECT i2000_{SR}, na kterém budu měřit vzorky pacientů a stanovovat hladinu anti- HCV protilátek. V případě pozitivního nálezu budu dále vzorky konfirmačně testovat, a to hned dvěma metodami. Nejprve pomocí metody ELISA a poté pomocí imunoblotu RecomLine.

Preanalytická fáze

Preanalytická fáze zcela zásadním způsobem ovlivňuje spolehlivost vyšetření. Při nedodržení všech požadavků preanalytické fáze dochází často k chybným výsledkům, které většinou nelze odhalit systémem laboratorní kontroly, přitom asi 60 % odchylek od správných hodnot vzniká právě v preanalytické fázi.

Preanalytickou fázi můžeme rozdělit na část:

- a) **mimolaboratorní**
- b) **laboratorní**

A) **Mimolaboratorní fáze zahrnuje:**

- poučení a přípravu pacienta k odběru biologického materiálu
- vlastní odběr
- identifikace biologického materiálu (identifikace pacienta) se správně vyplněnou žádankou
- transport do laboratoře v termotašce

Transport by měl být rychlý, šetrný a velmi důležitá je také teplota (obvykle 2 – 8 °C, z některých případech při -20 °C na suchém ledu).

B) Laboratorní fázi tvoří následující kroky:

- příjem a identifikace biologického materiálu – je nutno dbát na to, aby nedošlo k záměně pacientů např. při polepování zkumavek laboratorními štítky
- vložení identifikačních údajů pacienta do LISu a zadání požadovaných vyšetření (skenování OMR)
- příprava analytického vzorku – centrifugace
- vytvoření analytických vzorků – alikvotů (aliquoting) a jejich označení štítky s čárovým kódem (labeling)
- roztřídění analytických vzorků pro jednotlivá pracoviště laboratoře (sorting)

Správný odběr a identifikace pacienta

Na odběrové zkumavce musí být nalepený štítek se jménem a rodným číslem pacienta. Stejně údaje musí obsahovat žádanka. Na žádance musí být dále uvedený datum a čas odběru, kód klinického pracoviště (IČP), číselný kód diagnózy a pojišťovna pacienta.

Pracovníci příjmu kontrolují, zda souhlasí údaje na odběrové nádobce a na žádance, kontrolují typ použité odběrové nádoby vzhledem k požadovaným vyšetřením, aby došlo k co nejrychlejšímu odhalení případných chyb a byl včas kontaktován lékař nebo odběrové pracoviště.

Zadání požadavků na vyšetření

Při skenování žádanky pacienta s požadavky na vyšetření dojde k automatickému načtení metod, které pracovník příjmu zkontroluje, potvrdí, případně doplní vyšetření, které se nenačetla. Vyšetření se dá doplnit buďto konkrétní zkratkou nebo číselným kódem.

Je potřeba klást velký důraz na kontrolu, aby nedošlo k opomenutí či případnému zadání nepožadované metody.

Příprava analytického vzorku-centrifugace

Pro většinu biochemické a serologické analýzy se používá krevní sérum (srážlivá krev) nebo krevní plazma (nesrážlivá krev s přidavkem protisrážlivého činidla-antikoagulancia např. citrát sodný, K₃EDTA nebo heparin). Sérum nebo plazmu získáme jejich tzv. centrifugací.

Centrifuga je nezbytné laboratorní zařízení, určené k oddělení látek s různou specifickou hustotou za pomoci působení odstředivé síly. Základem centrifugy je elektromotor s možností plynulé regulace otáček. Běžně používané centrifugy mají rozsah do 5 000 otáček/ 1 minutu. Pro centrifugaci krevního vzorku běžně používáme **4 000 otáček** po dobu **5 minut**. Při vkládání vzorků do rotoru je potřeba dbát na to, aby byly vzorky rovnoměrně rozloženy s ohledem na protisměrné vyvážení, jinak by docházelo k vibracím, které mohou poškodit centrifugu či vzorky v ní uložené. Moderní typy centrifug dokáže provést vyvážení automaticky.

Centrifuga je vybavena zámek, který se uvolní až po zastavení pohybu rotoru. Centrifugací dojde k rozdělení krevních elementů (erytrocyty, leukocyty, trombocyty a v případě séra krevní sraženiny) se vzhledem k vyšší specifické hustotě účinkem odstředivé síly usadí v dolní části odběrové zkumavky a v horní části zůstává sérum, případně plazma. Po ukončení centrifugace naskládá obsluha vzorky zpět do stojánků k dalšímu zpracování.



Obrázek 7. Centrifuga (zdroj vlastní)

Třídění vzorků pro konkrétní pracoviště

Další kroky preanalytické fáze, jako jsou vytváření alikvotů z primární zkumavky, jejich označení štítkem a následné třídění do stojanů pro jednotlivá pracoviště, v naší laboratoři provádíme automatizovaně pomocí preanalytické linky OLA2500HS od firem *OLYMPUS* a AutoMate 2550 *BECKMANN COULTER*.



Obrázek 8. Preanalytická linka (zdroj vlastní)

Přístroj nám pomáhá k zrychlení provozu a snižuje možnost vzniku chyb. Obsluha vloží do vstupní části stojan s primárními vzorky, dopravní systém zkumavku uchopí, odzátkuje ji a ze zásobníku vyjme zkumavku pro alikvot.

Na alikvot nalepí štítek s čárovým, který musí obsahovat:

- jméno a příjmení pacienta
- rodné číslo
- laboratorní číslo
- datum
- zkratku materiálu
- přístroje a metody, ke kterým je určen

Pipetor umístěný na dopravním systému napipetuje do alikvotu přesně určené množství pro jednotlivý analyzátor a metodu. Dále je alikvot dopravním systémem zařazen do stojánku pro určenou metodu, odkud je odnesen do konkrétního úseku laboratoře na konečné měření.

Pokud je sérum či plazma vyšetřeno během 7 dnů po odběru, může být skladováno při teplotě 2–7 °C. Poté sérum/ plazmu skladujeme odseparované a zmrazené, při teplotě –20 °C. Po rozmrazení je nutné vzorek dobře promíchat. (Dastych, 2014)

4.1. Stanovení protilátek anti-HCV na analyzátoru Architect i2000SR

Architect i2000SR od firmy **ABBOTT** je automatický imunochemický analyzátor, který provádí stanovení protilátek anti-HCV imunoanalýzu ve dvou krocích využívající technologii **CMIA** = chemiluminiscenční imunoanalýzu na mikročasticích. Vzorek se smíchá s paramagnetickými mikročasticemi potaženými rekombinantním antigenem HCV spolu s ředícím roztokem pro metodu. Protilátky HCV přítomné ve vzorku se naváží na mikročástice. Po promytí se přidá konjugát anti-lidských protilátek s akridinem. Po dalším promývacím cyklu se do reakční směsi přidávají roztoky Pre-Trigger a Trigger. Výsledná chemiluminiscenční reakce se měří v relativních světelných jednotkách (RLU). Množství anti-HCV ve vzorku je přímo úměrné signálu v jednotkách RLU detekovaném optikou. Analyzátor je schopný měřit až 200 vzorků za hodin. Výsledky jsou zobrazeny na displeji, odkud je lze převést do LISu (laboratorní informační systém).



Obrázek 9. analyzátoru Architect i2000SR ABBOTT (zdroj vlastní)

K vyšetření používáme sérum získané ze žilní krve. Lze použít také plazmu získanou odběrem krve do zkumavky s heparinem, EDTA či citrátu sodného. Sérum i plazmu musíme před vyšetřením oddělit centrifugací. Vzorek nesmí obsahovat sraženiny a krevní elementy.

Příprava analyzátoru:

- 1.) Před započatím práce zkontrolujeme množství pracovních roztoků (triggeru a pre-triggeru), stav pevného a tekutého odpadu, množství reakčních nádobek (RV) a promývacího roztoku. Při výměně či doplnění některých vyjmenovaných částí, je nutné provést aktualizaci v záložce „ZÁSoby“ → „AKTUALIZOVAT ZÁSoby“ nebo „UPRAVIT MNOŽSTVÍ“.
- 2.) Zkontrolujeme reagenční soupravy, které do analyzátoru vkládáme ve stavu „PŘIPRAVEN“. Na nově otevřené reagenzii vyměníme víčko za septum, přes které může projít jehla pipetoru. U každé nové šarže nebo v případě nutnosti provedeme kalibraci.

Reagencie:

Reagencie zbavíme víčka a vyměníme je za septum. Abychom nové reagencie mohli vkládat do analyzátoru, musí být v módu „PŘIPRAVEN“, kdy lze otáčet s karuselem, a tudíž můžeme vybrat volné pozice pro umístění nové reagencie. Poté označíme oba moduly do stavu „ZPRACOVAT“. Dojde k „přeskenování“ reagenzií a načtení hladin reagenzií.



Obrázek 10. Reagencie Anti-HCV (zdroj vlastní)

Kalibrace

Po nainstalování metody je nutné provést kalibraci, po které dojde k vygenerování aktivní kalibrační křivky. Kalibraci je nutné provést při:

- použití nové šarže reagensů
- při expiraci kalibrační křivky
- pokud hodnoty kontroly metody nespádají do určeného rozmezí
- byla provedena výměna některých součástí vyžadující kalibraci
- po kalibraci je vždy nutné změřit hladiny příslušných kontrol.

System **Architect** ukládá kalibrační křivky a lze je prohlížet až 3 měsíce zpětně. Ke každé metodě náleží potřebný počet kalibrátorů, které je nutno použít. Kalibrace se provádí nakapáním potřebného objemu z originální lahvičky od firmy **ABBOTT**.

Objednání kalibrace provádíme manuálně tak, že zadáme ID stojánku, příslušnou pozici ve stojanu a zvolíme metodu, kterou chceme nakalibrovat v záložce „**OBJEDNÁNÍ KALIBRACE**“.

Lahvičky s kalibrátory uchováváme při teplotě 2–8 °C v lednici. Při zadávání nové šarže kalibrátoru je nutno uvést – název a koncentraci kalibrátoru, číslo šarže a datum expirace, absorbanci kalibrátoru. Přístroj následně sám stanoví cut-off hodnotu pro danou šarži.

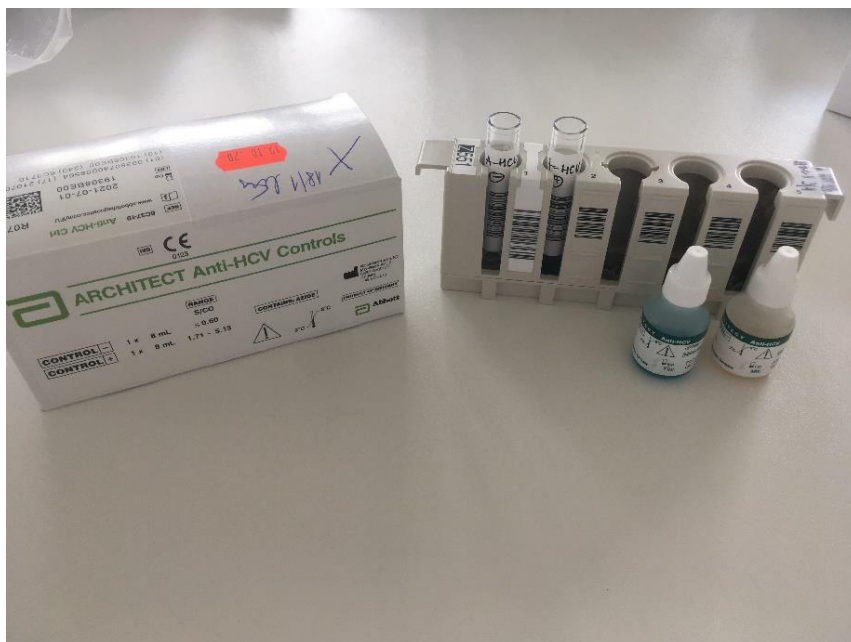


Obrázek 11. Kalibrátor Anti-HCV (zdroj vlastní)

Interní hodnocení kvality (IHK)

Interní kontroly měříme každý den ráno po provedení denní údržby před zpracováním rutinních vzorků od pacientů. Hodnoty se musí nacházet ve stanovených mezích.

Pro stanovení protilátek anti-HCV máme kontrolu pozitivní (modrá lahvička) a kontrolu negativní (bílá lahvička). Pokud se výsledná hodnota nachází mimo stanovený rozsah, je měření opakování s novou kontrolou (připravíme novou zkumavku s kontrolou z originálního balení).



Obrázek 12. Kontroly Anti-HCV (zdroj vlastní)

Přístroj sleduje statistické odchylky jednotlivých měření v rámci dané šarže a zobrazuje je v přehledném grafu. Pokud je opakovaně kontrola mimo mezí, metodu musíme kalibrovat.

Kontroly opatřeny čárovým kódem vložíme v nosiči do přístroje. Metody u jednotlivých kontrol jsou zadány v analyzátoru, ale můžeme je také načíst manuálně, stejně jako kalibrátory, v záložce „OBJEDNÁNÍ KONTROLY“.

Externí hodnocení kvality (EHK)

EHK pro protilátky anti-HCV provádí naše laboratoř 2krát ročně v kontrolním cyklu.

Měření vzorků

Séra pacientů s čárovým kódem zařadíme do nosiče a vložíme do přístroje. Minimální objem vzorku v nádobce je pro první test 150 μ l a pro každý následující test v téže nádobce plus 20 μ l. Pro statimové vyšetření platí minimální objem vzorku 70 μ l.

Zadání patientského vzorku lze také provést manuálně, jako tomu bylo u kalibrace či kontroly. V záložce „**OBJEDNÁNÍ PACIENTA**“ zadáme ID nosiče, polohu umístění vzorku, identifikaci vzorku a metodu, kterou chceme zpracovat. Objednávku na obrazovce potvrdíme „přidat objednávku“.

Výsledky:

Informace o rozpracovanosti séra pacienta nalezneme ve „**STAV OBJEDNÁVKY**“. Konečný výsledek vyšetřovaných metod nalezneme v záložce „**VÝSLEDKY**“, kde je označíme, vytiskneme a převedeme do LISu odkud je „uvolňujeme“ k hodnocení pro VŠS.

Celková variabilita testu (CV) byla stanovena výrobcem **5,1 – 13,4 %**. Specifita byla stanovena **99,45 – 99,71 %** a senzitivita **99,77 – 99,89 %**.

Analyzátor automaticky vypočítává výsledek vyšetření pro každý vzorek a kontrolu jako poměr hodnoty vzorku (RLU) k hodnotě cutoff (RLU) S/CO.

- Vzorky s indexem **cut-off <1,0** jsou **nereaktivní**. Tyto vzorky vydává vysokoškolský odborný pracovník negativní na anti –HCV a nemusí být dále vyšetřovány.
- Vzorky s indexem **cut-off \geq 1,0** jsou **reaktivní**. Všechny vzorky, jejichž výsledek primárního testu byl reaktivní, jsou znovu testovány v duplikátu.

Jestliže jsou výsledky v obou po sobě jdoucích testech „nereaktivní“, pak je možné považovat vzorek za HCV negativní.

Jestliže je však alespoň jedno z vyšetření reaktivní, pak je nutné považovat vzorek opětovně za reaktivní. Opakovaně reaktivní vzorky musí být vyšetřena doplňkový tzv. konfirmačními metodami (např. Immunoblot, ELISA nebo detekcí HCV – RNA).

Zodpovědný odborný vysokoškolský pracovník se po telefonické domluvě s lékařem rozhodne, zda laboratoř provede konfirmační vyšetření.

Výsledek konfirmačního vyšetření:

konfirmační vyšetření	anti-HCV	konečný výsledek konfirmace
negativní	reaktivní	negativní
pozitivní	reaktivní	pozitivní

Tabulka 1. Výsledek konfirmačního vyšetření

Je – li výsledek konfirmačního vyšetření **negativní**, vydá VŠ výsledek protilátek anti – HCV jako **reaktivní**, avšak výsledek konfirmace jako **negativní**, viz. tabulka první řádek.

Jsou – li oba výsledky **pozitivní**, vydá VŠ výsledek protilátek anti – HCV jako **reaktivní** a výsledek konfirmace jako **pozitivní**, viz druhý řádek v tabulce.

Vysokoškolský pracovník k výsledku pacienta vloží komentář s doporučením na stanovení HCV RNA pomocí metody PCR, zopakování vyšetření v časovém odstupu, eventuálně odešle vzorek do NRL (národní referenční laboratoř) pro hepatitidy.

Jde – li o první záchyt u pacienta, je nutno od lékaře zjistit bydliště pacienta a provést hlášení na místně příslušnou hygienickou stanici.

4.2. Konfirmační test

Každý reaktivní výsledek protilátek (anti-HCV) musí být ověřen dalším testem na jiném principu. Pro konfirmační testování používáme sérum získané ze žilní krve. Lze použít také plazmu získanou odběrem krve do zkumavky s heparinem, EDTOU či citrátu

sodného. Sérum i plazmu musíme před vyšetřením oddělit centrifugací. Vzorek nesmí obsahovat sraženiny a krevní elementy.

4.2.1. Konfirmační test pro ověření positivity anti-HCV metodou ELISA

Mikrotitrační destičky jsou pokryty stripy s HCV – specifickými syntetickými antigeny odvozenými z oblastí „core“, „ns“ a „env“, kódujících konzervativní imunodominantní antigenní determinanty (Core, NS3, NS4, NS5 a Env).

Antigeny jsou do jamek tvořící stripy navázány takto:

Pozice	Antigen	Složení
A	Není	Jamka pro blank
B	Casein	Negativní interní kontrola
C	Core	Specifický syntetický antigen
D	NS3	Specifický syntetický antigen
E	NS4	Specifické syntetické antigeny
F	NS5	Specifický syntetický antigen
G	Env	Specifické syntetické antigeny
H	hIgG	Pozitivní interní kontrola

Tabulka 2. Pozice antigenů v jamkách

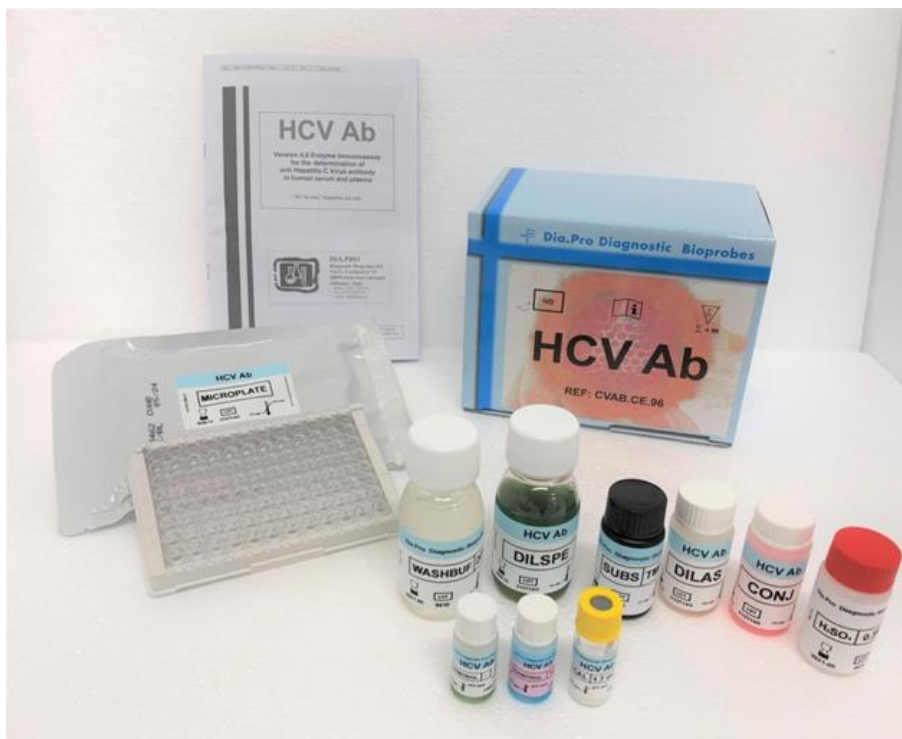
Princip:

Na strip nejprve nanese vzorek, který se při screeningu projevil jako reaktivní. Pokud jsou přítomny protilátky anti – HCV, jsou zachyceny specifickými antigeny. Po vymytí všech ostatních složek vzorku jsou při druhé inkubaci vázané HCV Ab detekovány přidáním protilátek anti-hIgG & IgM, značené peroxidázou. Enzym navázaný na pevné fázi, působící na směs substrát/chromogen, generuje optický signál, který je úměrný počtu protilátek anti-HCV ve vzorku.

Účelem kontrol obsažených v soupravě je zajistit interní zkoušku analytického systému.
Vzorek je potvrzen jako pozitivní, pokud jsou přítomny alespoň dvě specifické reaktivity.

Obsah soupravy:

- Microplate (mikrodestička)
- Enzymatický konjugát (CONJ) – Proteinový pufr obsahující specifickou protilátku anti – hIgG & IgM, značenou HRP (peroxidázou), je připraven k okamžitému použití.
- Promývací pufr (WASHBUF20X) – Koncentrovaný fosfátový pufr určen k naředění.
- Chromogen/substrát (SUBS TMB) – Roztok obsahuje tetramethylbenzidin (TMB) a peroxid vodíku (H_2O_2) spolu s aktivátory a stabilizátory, rozpuštěné ve fosfátovém/citrátovém pufru.
- Stop roztok – H_2SO_4 0,3 M
- Negativní kontrola (CONTROL -)
- Pozitivní kontrola (CONTROL +)
- Roztok na ředění vzorků (DILSPE) – Proteinový roztok určený na přípravu vzorků.



Obrázek 13. Konfirmační souprava ELISA pro stanovení protilátek anti-HCV (DIA.PRO)

Podmínky správného testování:

- ✓ Všechny reagensie necháme nejméně po dobu 60 minut vytemperovat na laboratorní teplotu.
- ✓ Používáme automatické pipety a jednorázové špičky, které nejsou součástí balení.
- ✓ Při odebírání z lahvíček bráníme kontaminaci opatrným pipetováním, kdy se nedotýkáme špičkami stěn jamek mikrotitračních destiček, aby nedošlo ke křížové kontaminaci.
- ✓ Při promývání používáme pouze promývací roztok, který je součástí soupravy kitu.
- ✓ Směs substrát/chromogen nesmí přijít do styku s oxidačními činidly a kovovými povrchy.
- ✓ Během inkubace a přípravy reagensí zabráníme vystavení silnému zdroji světla.
- ✓ Pro přípravu směsi substrát/chromogen používáme pouze plastové jednorázové čisté a sterilní nádobí.
- ✓ S potenciálně infekčními vzorky a materiály zachází opatrně, protože mohou být zdrojem infekce.
- ✓ Se všemi objekty, které přijdou do přímého kontaktu se vzorky je třeba zacházet jako s potenciálně infekčními a jako takové je třeba je i likvidovat.

Příprava roztoků:

Promývací pufr (20krát koncentrovaný) naředíme destilovanou vodou v poměru 1 díl koncentrátu + 19 dílů vody (např. 60 ml koncentrátu + 1 200 ml destilované vody). Před použitím jemně protřepat.

Příprava vzorků:

Před použitím je potřeba všechny reagensie důkladně promíchat na vortexu (míchačce). Vzorky sér (plazmy) naředíme ředícím roztokem vzorků v poměru 1:50 (tj. 20 μ l séra v označené ředící zkumavce + 1 ml ředícího roztoku) a důkladně promícháme.

Pracovní postup:

1. Připravíme si příslušný počet stripů na vzorky a kontroly (1 vzorek = 1 strip)
2. Do příslušných stripů pipetujeme do každé jamky (kromě A – blank) 100 μ l jemně protřepaných kontrol (1 pozitivní a 1 negativní) nebo naředěných roztoků. Překryjeme víčkem nebo fólií.
3. Inkubujeme při 37 °C po dobu 60 minut.
4. Roztok odsajeme a destičku 5x promyjeme na promývače 350 μ l naředěného promývacího roztoku, důkladně odsajeme a osušíme o buničitou vatu. Promývací roztok necháme v jamce působit cca 30 – 60 sekund.
5. Do všech jamek, kromě A1, pipetujeme 100 μ l konjugátu. Překryjeme víčkem nebo fólií.
6. Inkubujeme při 37 °C po dobu 60 minut.
7. Roztok odsajeme, promyjeme 5x na promývače 350 μ l pomocí promývacího roztoku, důkladně odsajeme a osušíme o buničitou vatu. Promývací roztok necháme v jamce působit 30 – 60 sekund.
8. Do všech jamek (včetně A1) pipetujeme 100 μ l TMB substrátu. Překryjeme víčkem nebo fólií.
9. Inkubujeme v temnu při laboratorní teplotě po dobu 20 minut.
10. Reakci zastavíme přidáním 100 μ l zastavovacího roztoku do všech jamek (včetně A1) a protřepeme. Pozitivní reakce se projeví žlutým zbarvením.
11. Změříme absorbanci na fotometru při 450/630 nm. Vzniklé zbarvení je stabilní cca 20 minut po zastavení reakce. Měříme v programu readeru REVELATION metodu HCV Ab Conf DIA PRO.asy. (viz foto)



Obrázek 14. Reader of firmy DYNEX (zdroj vlastní)

Kontrola kvality:

Zařazení pozitivní (K+) a negativní kontroly (K -) ke každému stanovení. Limity pro OD kontrol a blanku musí být splněny.

OD blanku (A1)	<0,100
OD negativní kontroly v jamkách B až G	<0,200
OD pozitivní kontroly v jamce B	<0,200
Od pozitivní kontroly v jamkách C až G	> (0,350 + OD jamky B pozitivní kontroly)
OD v jamkách H	>0,750
OD v jamkách B	<0,350

Tabulka 3. Rozmezí kontrol kvality

Hodnocení:

Hodnotíme vždy celý strip (sloupec) jako celek.

Negativní	OD v jamkách C až G	< (0,350 + OD jamky B)
Falešně pozitivní	OD jamky B	> 0,350
Nejasný	OD jedné z jamek C až G	> (0,350 + OD jamky B)
Pozitivní	OD 2 a více jamek C až G	> (0,350 + OD jamky B)

Tabulka 4. Hodnocení výsledků

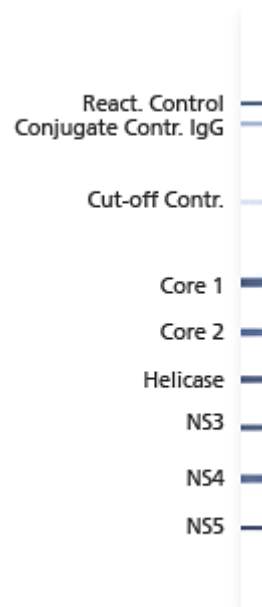
4.2.2. Konfirmační test pro ověření IgG protilátek pozitivitu HCV metodou immunoassay

Test recomLine IgG používá vysoce čištěné rekombinantní antigeny HCV z oblasti Core, NS3, NS4 a NS5, které jsou naneseny na stripy nitrocelulózové membrány.

Rekombinantní antigeny

oblast	antigen
Core 1	strukturní protein
Core 2	strukturní protein
Helikáza	nestructurní protein - část z NS3 s aktivní helikázou
NS3	nestructurní protein s proteázou a aktivní helikázou
NS4	nestructurní protein
NS5	nestructurní protein

Tabulka 5. Poloha rekombinantních antigenů na stripu



Obrázek 15. Strip s antigeny (zdroj RecomLine)

Princip:

Testované stripy se inkubují se vzorkem naředěného séra nebo plazmy a specifické protilátky se vážou na patogenní antigeny na testovaných stripech.

Nenavázané protilátky se odstraní promytím. V druhém kroku se stripy inkubují s anti-lidskými imunoglobulinovým protilátkami (IgG), které jsou konjugovány s křenovou peroxidázou.

Nenavázané konjugované protilátky se odstraní promytím.

Specificky navázané protilátky se detekují barevnou reakcí katalyzovanou peroxidázou. Pokud došlo k reakci antigen-protilátka, objeví se v odpovídajícím místě na stripu tmavá linie.

K vyšetření se používá sérum získané ze žilní krve, případně lze použít také plazmu, získanou do zkumavky s heparinem, EDTA nebo citrátem.

Stabilita protilátek je 2 týdny při 2–8 °C, poté při $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Po rozmrazení je nutné vzorek důkladně promíchat.

Pro analýzu nelze použít tepelně inaktivované, hemolytické, ikterické, chylózní a zakalené vzorky.

Vzorky pacientů, kontrolní séra a veškerý materiál, který přichází do styku se vzorky pacientů, je třeba považovat za potenciálně infekční.

Reagencie:

Balení obsahuje 20 testů. Reagencie musí být skladovány při teplotě 2 – 8°C a jsou stabilní do doby expirace.

- Koncentrát promývacího pufru A (100 ml)
- Mléko v prášku (5 g)
- Koncentrát konjugátu (500 µl)
- Testovací stripy (20 stripů)
- Pozitivní kontrolu IgG (140 µl)
- Negativní kontrolu IgG (140 µl)
- Substrát (40 µl)



Obrázek 16. Souprava recomLine pro konfirmační stanovení protilátek anti-HCV (zdroj vlastní)

Příprava roztoků:

Reagencie	Vzorec (1 strip)	Příklad na 5 stripů
Mléko v prášku	Počet stripů x 0,1	0,5 g
Koncentrát promývacího pufru A	Počet stripů x 2	10 ml
Deionizovaná voda	Počet stripů x 18	90 ml
Promývací pufr A k přímému použití (pro ředění séra, konjugátu, pro promývaná)	Počet stripů x 20	100 ml

Tabulka 6. Návod k přípravě roztoků

Mléko v prášku musíme rozpustit v koncentrátu promývacího roztoku A. Směs doplníme deionizovanou vodou do konečného objemu (1+9).

Promývací pufr A ředíme v poměru 1:10 destilovanou vodou (100ml koncentrátu + 900 ml vody).

Postup:

1. Nejprve vytemperujeme všechny reagenty na laboratorní teplotu.
2. Do příslušného počtu žlábků pipetujeme 2 ml připraveného promývacího pufru A a vložíme plastovou pipetou po jednom stripu lícni stranou s číslem umístěným nahoru.
3. Do každého žlábků pipetujeme 20 μ l naředěného vzorku (ředění 1:100).
4. Inkubujeme 3 hodiny na třepačce při laboratorní teplotě.
5. Promyjeme 3x odsátím a odkapáním na filtrační papír, poté každý žlábek znovu naplníme 2 ml připraveného promývacího roztoku, 5 minut třepeme na třepačce při laboratorní teplotě a totéž zopakujeme ještě dvakrát. Na závěr zcela odsajeme roztok ze žlábků.
6. Naředíme konjugát 1 + 100 (koncentrát konjugátu + připravený promývací pufr A) viz tabulka.

Reagenci	Vzorec (1 strip)	5 stripů
Koncentrát konjugátu	Počet stripů x 20 μ l	100 μ l
Prom. pufr A k přímému použití	Počet stripů x 2 ml	10 ml

Tabulka 7. Návod k ředění konjugátu

7. Pipetujeme 2 ml příslušného naředěného konjugátu do příslušného žlábků, inkubační vaničku překryjeme plastovým krytem.

8. Inkubujeme na třepačce 45 minut při laboratorní teplotě.
9. Promyjeme 3x odsátím a odkapáním na filtrační papír, poté každý žlábek znovu naplníme 2 ml připraveného promývacího roztoku, 5 minut třepeme na třepačce při laboratorní teplotě a totéž zopakujeme ještě dvakrát. Na závěr zcela odsajeme roztok ze žlábků.
10. Pipetujeme 1,5 ml substrátu do každého žlábků.
11. Inkubujeme na třepačce 8 minut při laboratorní teplotě.
12. Odsajeme tekutinu ze všech žlábků a 3x krátce promyjeme každý strip cca 1,5 – 2 ml destilované vody.
13. Nalepíme stripy na označená pole vyhodnocovacího protokolu a necháme uschnout. Chráníme před přímým slunečním světlem.

Pokud chceme analýzu provádět na automatu, je nutno ručně pipetovat pouze vzorky a konjugát. Ostatní kroky jsou automatizovány na přístroji Dynablot od firmy DYNEX, pod názvem programu „HCV konfirmace“.



Obrázek 17. Blotter od firmy Dynex (zdroj vlastní)

Vyhodnocení intenzity proužků hodnocené podle cut – off linie

Barevná intenzita proužků	Vyhodnocení
Žádná reakce	-
Velmi nízká intenzita (slabší než cut-off linie)	+/-
Nízká intenzita (stejná jako cut-off linie)	+
Silná intenzita (silnější než cut-off)	+
Velmi silná intenzita	+

Tabulka 8. Hodnocení intenzity proužků

Interpretace výsledků

Výsledek testu	Kritéria
Negativní	<ul style="list-style-type: none"> • žádný antigen \geq cut-off <u>nebo</u> • samotný NS3, N34 nebo N35 \geq cut-off
Hraniční	<ul style="list-style-type: none"> • samotný core 1 \geq cut-off <u>nebo</u> • samotný core 2 \geq cut-off <u>nebo</u> • samotná helikáza \geq cut-off <u>nebo</u> • helikáza a jeden NS protein (NS3, N34 nebo NS5) \geq cut-off <u>nebo</u> • kterékoliv jiné dva antigeny \geq cut-off
Pozitivní	<ul style="list-style-type: none"> • core 1 a core \geq cut-off nebo • core 1 a jeden další antigen \geq cut-off <u>nebo</u> • core 2 a jeden další antigen \geq cut-off <u>nebo</u> • kterékoliv tři antigeny \geq cut-off

Tabulka 9. Hodnocení výsledků

5. Výsledky

5.1. Výsledky konfirmace pomocí ELISA

V naší laboratoři při každém provádění enzymové imunoanalýzy ELISA vytváříme nejprve plán do předem nachystané šablony. Zaznačíme si pozice blanku (BL), negativní kontroly (-), pozitivní kontrol (+) a dále pozice patientských sér pod laboratorními čísly. V našem případě tvoří první strip negativní kontrola, 2 strip pozitivní kontrola a dále za sebou umístěno 5 pacientů.

ELISA HCV konfirmace

Datum: 28.2.2020 Vypracoval: Bačková M.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL					
B	-	+	4041 402 804	4041 406 789	4041 416 451	4041 378 663	4041 434 664					
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Obrázek 18. ELISA plán (zdroj vlastní)

Ve výsledkovém listu z „readeru“ odečteme naměřené hodnoty, podle parametrů od výrobce soupravy. Měření jsem provedla v programu „REVELATION“ na přístroji reader od firmy *Dynex*.

DYNEX TECHNOLOGIES REVELATION 4.25

TEST NO.	:	W/L MODE	:	DATE	:
TEST NAME	:	TEST FILTER	:	TIME	:
PLATE	:	REF. FILTER	:	OPERATOR	:

: HCV AB CONF DIAPRO
 : HCVkon20200228
 : DUAL
 : 450 nm
 : 630 nm
 : 28.2.2020
 : 13:10:02
 :

Average blank value = 0.010

Q.C. equations

B<0.100	0.009<0.100
NC1<0.200	0.014<0.200
PC1<0.200	0.052<0.200
T1<0.350	0.134<0.350
NC7>0.750	2.778>0.750
PC7>0.75	2.911>0.750
T7>0.75	3.036>0.750
NC2<0.200	0.013<0.200
NC3<0.200	0.012<0.200
NC4<0.200	0.016<0.200
NC5<0.200	0.012<0.200
NC6<0.200	-0.006<0.200
PC2>(0.350+B)	3.212>0.359
PC3>(0.350+B)	3.021>0.359
PC4>(0.350+B)	3.109>0.359
PC5>(0.350+B)	1.037>0.359
PC6>(0.350+B)	2.588>0.359

DATA MATRIX/TABLE : OD

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	*****	*****	*****	*****	*****
B	0.014	0.052	0.134	0.112	0.129	0.176	0.083	*****	*****	*****	*****	*****
C	0.014	3.212	0.384	2.287	1.414	3.115	0.112	*****	*****	*****	*****	*****
NC6<0.200	0.012	3.022	0.329	0.513	0.406	2.379	0.145	*****	*****	*****	*****	*****
PC2>(0.350+B)	0.017	3.109	0.182	1.178	0.397	OVER	0.078	*****	*****	*****	*****	*****
F	0.013	1.037	0.321	0.130	0.190	0.255	0.103	*****	*****	*****	*****	*****
G	-0.007	2.589	0.204	0.180	0.140	1.546	0.101	*****	*****	*****	*****	*****
H	2.778	2.911	3.036	3.127	3.177	2.841	2.922	*****	*****	*****	*****	*****

***** Indicates an unread well or value out of range

Obrázek 19. Výsledkový list z readeru DYNEX (zdroj vlastní)

Negativní i pozitivní kontroly vyšly správně.

OD blanku (A1)	<0,100
OD negativní kontroly v jamkách B až G	<0,200
OD pozitivní kontroly v jamce B	<0,200
Od pozitivní kontroly v jamkách C až G	> (0,350 + OD jamky B pozitivní kontroly)
OD v jamkách H	>0,750
OD v jamkách B	<0,350

Tabulka 10. Hodnocení pro kontroly kvality pro metodu ELISA

Negativní kontrola byla naměřena v jamkách B až G vždy méně než <0,20.

Pozitivní kontrola byla naměřena v jamkách C až G > (0,350 + OD jamky B pozitivní kontroly).

Při hodnocení pacientů používáme předem definovanou tabulku od výrobce. Hodnotíme vždy celý strip (sloupec) jako celek.

Negativní	OD v jamkách C až G	< (0,350 + OD jamky B)
Falešně pozitivní	OD jamky B	> 0,350
Nejasný	OD jedné z jamek C až G	> (0,350 + OD jamky B)
Pozitivní	OD 2 a více jamek C až G	> (0,350 + OD jamky B)

Tabulka 11. Hodnocení výsledků pro metodu ELISA

3. sloupec

Pacient s laboratorním číslem **4041 402 804** splňuje hodnoty OD v jamkách C až G <(0,350 + OD jamky B). Není pozitivní na žádný z antigenů, tudíž je pacient při naší konfirmaci hodnocen jako **negativní**.

4. sloupec

Pacient s laboratorním číslem **4041 406 789** splňuje v jamce C, D a E > (0,350 + OD jamky B), je pozitivní ve 3 antigenech, tudíž pacienta hodnotíme jako **pozitivního**.

5. sloupec

Pacient s laboratorním čísle **4041 416 451** splňuje pozitivitu podle vzorce OD v jamkách C až G $> (0,350 + \text{OD jamky B})$ pouze v jamce C, tudíž jeho výsledek hodnotíme jako **nejasný**.

6. sloupec

Pacient s laboratorním číslem **4041 378 663** splňuje vzorec OD v jamkách C až G $> (0,350 + \text{OD jamky B})$, a to dokonce ve 4 antigenech. Pacienta hodnotíme jako **pozitivního**.

7. sloupec

Naopak poslední pacient s laboratorním číslem **4041 434 664** nemá pozitivní žádný antigen. Jeho naměřené hodnoty odpovídají vzorci OD v jamkách C až G $< (0,350 + \text{OD jamky B})$. Pacient je jasně **negativní**.

5.2. Výsledky konfirmačního stanovení pomocí recomLine

Výsledky z konfirmačního testování metodou recomLine odečítáme pomocího předtištěného stripu na šabloně od výrobce Mikrogen Diagnostik. Do pole s příslušným antigenem zapisujeme znaky:

+ pacient je na daný antigen pozitivní

- pacient je na daný antigen negativní

Probe Sample	recomLine HCV Art.Nr. 4372 Art.No.	Nr. No.	Antigenbanden Antigen bands						Beurteilung Interpretation
			Core 1	Core 2	Heli- case	NS3	NS4	NS5	
4041 402 804	LHC 04	1							

Pacient s laboratorním číslem **4041 402 804** nám v případě konfirmace metodou recomLine vyšel taktéž negativní na všech antigenech, jako tomu bylo při konfirmaci ELISOU. Pacient je **negativní**.

6. Diskuze

Virová hepatitida C je stále velmi závažné onemocnění postihující játra, které může vést až k vzniku hepatocelulárního karcinomu a velmi často také k nutnosti transplantaci jater. Tato nemoc je také zrádná v tom, že je velmi často asymptomatická a k odhalení přichází mnohdy až v chronické fázi klidně i po desítkách let od expozice virem, to komplikuje i neexistence vakcíny kvůli mutaci viru. Proto se Česká hepatologická společnost (ČLS JEP) ve spolupráci s WHO (světová zdravotnická organizace) snaží aktivně oslovit praktické a diagnostické lékaře, aby prováděli screeningové vyšetření u rizikových skupin pacientů. Screeningové vyšetření protilátek anti-HCV se provádí vždy u dárců krve, krevních elementů, orgánů a tkání od roku 1992.

První hypotézou bylo, že je ELISA přesnější než recomLine. Je tomu však naopak. RecomLine obsahuje na stripech oblast antigenu „core 1“ a „core 2“, kdežto ELISA obsahuje pouze oblast „core“. Navíc má ještě recomLine oblast antigenu „helikáza“, kterou ELISA vůbec nemá. ELISA obsahuje navíc oblast „env“ (specifický syntetický antigen), kterou však nehodnotíme. Takže je první hypotéza vyvrácena.

Druhou hypotézou byla otázka, zda je test recomLine vhodnější pro praxi než ELISA? V praktické části jsem měla možnost vyzkoušet obě tyto metody a sama je posoudit. Z mého pohledu je vhodnější práce se soupravou recomLine než pomocí ELISA. Na začátku práce s imunoblotem je velmi důležitá správná příprava, vytemperování soupravy na správnou teplotu, přichystání všech pomůcek, jako jsou pipety a jednorázové špičky, laboratorní sklo a vaničku. Seřadíme si patientská séra podle pracovního listu a připravíme si plán. Poté si pečlivě napipetujeme správné množství promývacího roztoku s koncentrátem konjugátu IgG. V provozu laboratoře budeme používat přístroj DYNABLOT, který zapneme a promyjeme hadičky roztoky, které budeme používat. V dalším kroku vložíme do žlábků potřebný počet stripů a napipetujeme patientská séra. Poté dochází k inkubaci a všechny následující kroky za nás provede přístroj DYNABLOT.

Pro laboratorní provoz je tahle metoda rozhodně vhodnější než konfirmace pomocí ELISA, která obsahuje více po sobě jdoucích kroků, vyžadujících manuální obsluhu laboranta. Hypotéza byla potvrzena, a proto se také naše laboratoř rozhodla pro výměnu konfirmačního testování pomocí ELISOU za recomLine.

Třetí hypotéza zní, zda je recomLine rychlejší než ELISA a zda jsou výsledky totožné. U testu recomLine je důležitá příprava před zahájením práce. Poté trvá testování zhruba 4 hodiny 30 minut. U testu ELISA je důležitá pečlivá práce po celou dobu. Celkově trvá ELISA asi 3 hodiny, ale i přes kratší dobu provedení, je ELISA pro pracovníka laboratoře časově náročnější. Odpověď na třetí hypotézu tedy zní, že recomLine není rychlejší než ELISA, avšak pro práci v laboratoři je méně časově náročnější. Výsledky obou testů jsou totožné.

7. Závěr

Ve své práci jsem se hlouběji seznámila s problematikou virové hepatitidy C.

V teoretické části jsem se zaměřila na onemocnění hepatitidy C obecně a na vir HCV nemoc způsobující. Zajímalo mě také porovnání výskytu onemocnění v České republice a v jiných zemích světa. Nemohla jsem také opomenout způsob přenosu viru, protože ač se to nemusí zdát, nemocí se může nakazit kdokoliv z nás, i když nepatří do rizikové skupiny. Jako pracovníci ve zdravotnictví bychom si měli uvědomit, že je potřeba nosit ochranné pomůcky a dodržovat nutná opatření při práci s biologickým materiálem, protože prevence je v tomhle případě jedna z nejdůležitějších věcí.

Dále jsem v teoretické části vysvětlila rozdíl mezi akutní a chronickou hepatitidou C a to, že odhalení akutního stádia bývá velmi vzácné, protože průběh nemoci v této fázi je většinou asymptomatický. Nemoc v chronické fázi může způsobit velmi vážné zdravotní komplikace, od vzniku hepatocelulárního karcinomu až po smrt. Velmi často dochází k odhalení až ve fázi, kdy je potřeba provést transplantaci jater.

V poslední fázi teoretické části jsem stručně popsala možnosti laboratorní diagnostiky, ať už sérologický screening na přístroji **ARCHITECT** s případnou nutností konfirmace, kde popisují principy dvou konfirmačních testů, které jsem si měla možnost vyzkoušet i v praktické části. Stručně jsem popsala molekulárně – genetické vyšetření HCV – RNA pomocí metody PCR, které se dnes hojně využívá a je nezbytné pro správné nastavení léčby, kterou jsem popsala v poslední části teorie.

V praktické části jsem si vyzkoušela vše od příjmu vzorku, označení žádanky i materiálu štítkem, až po skenování žádanky a zadávání jednotlivých vyšetření. Poté jsem žádanku zkontrolovala, jestli je vše správně zapsáno a dokončila jsem poslední úpravy žádanky. Dále jsem krev vložila do centrifugy, kde došlo pomocí odstředivé síly k oddělení krevních elementů od séra. S vytvořením alikvotu mi pomohla naše preanalytická linka **OLYMPUS** od firmy *BECKMANN COULTER*, která je v laboratorním provozu velmi nápomocná a urychluje celý chod laboratoře.

Po preanalytické části následovalo samotné měření protilátek anti-HCV na přístroji **ARCHITECT**, který je ráno potřeba nachystat, doplnit vše potřebné, provést denní údržbu a změřit kontroly. Až po změření kontrol, které musí vyjít v referenčním rozmezí

může dojít k měření patientských sér. Obsluha analyzátoru není složitá, vzorky se naskládají do stojanu a vloží do volné pozice. Pacienti jsou uloženi pod specifickým laboratorním číslem, kde jsou také vyplněny metody k vyšetření a díky tomu se automaticky načítají. Výsledky se tisknou v papírově formě a také se převádějí do LISu (laboratorního informačního systému), kde je potom laborant prochází, kontroluje a v případě positivity volá VŠ.

S konfirmačními testy **ELISA** od firmy *DIA.PRO* a **recomLine** od firmy *Mikrogen Diagnostik* se mi v obou případech pracovalo dobře. S oběma soupravami jsem pracovala podle manuálu, který je v soupravě. Laboratoř **SYNLAB** je vybavena ke každé metodě vlastním pracovním postupem SOP.

Obě soupravy obsahovaly všechny popsané komponenty, které jsou uvedeny na krabici. Výhodou **ELISA** oproti **recomLine** je, že všechny reagenty jsou připraveny hned k použití, kdežto u **recomLine** si musíme připravit ředící roztok s mléčným práškem, který se dlouho rozpouští, a proto ho připravujeme předem na další použití. V případě **recomLine** si musíme také připravit konjugát IgG, který ředíme z promývacího roztoku a koncentrátu konjugátu. Konjugát připravujeme podle počtu pacientů (stripů).

Práce s **ELISA** však potřebuje více manuální obsluhy laboranta než **recomLine**. Na začátku práce s **ELISA** je potřeba napipetovat kontroly a naředit si séra pacientů, které dále také pipetují do mikrotitrační destičky. K těmto krokům je zapotřebí, aby měl laborant zkušenosti s pipetováním a byl zručný, jinak může dojít k chybě, která povede ke špatným výsledkům. Dále si u **ELISA** musíme hlídat přesně čas inkubace, který je v návodu, aby reakce proběhly vždy za stejných podmínek. Pozor si musíme dávat také při promývání a následném sušení jamek. A v neposlední řadě musíme být velmi opatrní při pipetování reagentů, abychom nepoškrábali stripy.

Co se týče hodnocení výsledků, tak první pacient byl v obou případech negativní pro všechny antigeny. Druhý pacient byl při **ELISA** pozitivní v antigenech „core“ „NS3“ a „NS4“, kdežto pomocí **recomLine** pouze v oblasti „core 1“ a „helikáza“. Třetí pacient byl naopak pomocí **ELISA** pozitivní pouze na první oblasti „core“, což odpovídá nejasnému výsledku, kdežto na stripu má nález na „core“ i „NS4“, takže nám **recomLine** potvrdil pozitivitu. Čtvrtý pacient vychází pomocí **ELISA** pozitivní na antigeny „core“, „NS3“, „NS4“ a „env“, což je specifický syntetický antigen, který se ovšem nenachází

na stripu od **recomLine**. **RecomLine** zachytil pozitivitu pouze v oblasti „core“. Pro srovnání přikládám 2 tabulky s výsledky pro každou metodu zvlášť.

	4041 402 804	4041 406 789	4041 416 451	4041 378 663	4041 434 664
Core	negativní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní
NS3	negativní	pozitivní	negativní	pozitivní	negativní
NS4	negativní	pozitivní	negativní	pozitivní	negativní
NS5	negativní	negativní	negativní	negativní	negativní
Env	negativní	negativní	negativní	pozitivní	negativní

Tabulka 12. Výsledky měřených vzorků pomocí metody ELISA

	4041 402 804	4041 406 789	4041 416 451	4041 378 663	4041 434 664
Core 1	negativní	pozitivní	pozitivní	pozitivní	nebylo zjištěno
Core 2	negativní	negativní	negativní	pozitivní	nebylo zjištěno
Helikáz a	negativní	pozitivní	negativní	negativní	nebylo zjištěno
NS3	negativní	negativní	negativní	negativní	nebylo zjištěno
NS4	negativní	negativní	pozitivní	negativní	nebylo zjištěno
NS5	negativní	negativní	negativní	negativní	nebylo zjištěno

Tabulka 13. Výsledky měřených vzorků pomocí imunoblotu RecomLine

Výsledky obou testů nejsou totožné pro všechny antigeny, což je způsobeno tím, že neobsahují zcela totožné antigeny. V konečných výsledcích se však shodují, což je velmi důležité.

U **recomLine** je důležité odečítat výsledky co nejdříve, protože stripy jsou citlivé na světlo.

Stripy recomLine obsahují také více oblastí antigenů oproti ELISA, která detekuje „core“, kdežto recomLine detekuje „core 1“ a „core 2“ a má navíc oblast „helikáza“.

Z mého pohledu je tedy pro provoz v naší laboratoři SYNLAB vhodnější souprava **recomLine**, protože ji lze převést na blotter od firmy *DYNABLOT*, kdežto souprava **ELISA** potřebuje více manuální obsluhy a zručnosti laboranta.

8. Literatura

1. Anti-HCV (příbalový leták) [online]. Dostupné z <https://www.abbottdiagnostics.cz/>
2. BENETT E. J., Pediatric Hepatitis C [online]. Dostupné z <https://emedicine.medscape.com/article/964761-overview>
3. BENEŠ J. Praha 2009, Infekční lékařství, nakladatelství Galén, 1.vydání, 651s., ISBN 978-80-7262-644-1, (strana 140)
4. CHAPEL H. a spol, Praha 2018, Základy klinické imunologie, nakladatelství TRITON, 6.vydání, 323 s., ISBN 978-80-7553-396-8 (strana 264)
5. Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, Tisková konference České hepatologické společnosti [online]. © [cit. 2021-03-21]. Dostupné z <https://www.cls.cz/tiskove-konference-cls-jep>
6. ČESKÁ HEPATOLOGICKÁ SPOLEČNOST, Standardní diagnostický a terapeutický postup chronické infekce virem hepatitidy C (HCV) [online]. Dostupné z <https://www.ces-hep.cz/file/595/2018-guidelines-hcv-chssil-1.pdf>
7. DASTYCH M. a kolektiv, Brno 2014, Instrumentální technika, tiskárna KNOPP, 2.doplněné vydání, 201s. ISBN 978-80-210-7103-2, (strany 186-192)
8. DASTYCH M. a kolektiv, Brno 2015, Klinická biochemie, tiskárna KNOPP, 2. vydání., 252s., ISBN 978-80-87192-18-4, (strana 44)
9. DIA.PRO (2006) INS CCONF.CE/- příbalový leták DHAWAN V. K., Hepatitis C [online]., 7.10.2019. Dostupné z <https://emedicine.medscape.com/article/177792-overview>
10. DIA.PRO, HCV Ab – ELISA (návod k použití) <https://www.diapro.it/products/hcv-ab-elisa/>
11. EHRMANN J., MŮLEK P. Praha 2010, Hepatologie, nakladatelství Grada, 1. vydání, 616 str., ISBN 978-80-247-3118-6 (strany 239, 241, 264)
12. GREENWOOD D., SLACK R.C.B., PEUTHERER J.F, Praha 1999, Lékařská mikrobiologie, vydavatelství Grada Publishing spol. s.r.o., 1.vydání, 690s., ISBN 80-7169-365-0 (strany 457, 535, 539)
13. HUSA. P. Praha 2005, Virové hepatitidy, nakladatelství Galén, 1.vydání, 247s., ISBN 80-7262-304-4 (strana 43)

14. HŮLEK P. a spol, Hepatologie, nakladatelství Grada, 2. vydání, 768s., ISBN 978-80-247-2939-8 (strana 268)
15. KREKULOVÁ L., ŘEHÁK V., Praha 1998, Virové hepatitidy, nakladatelství Triton, 1. vydání, 59s. ISBN 80-85875-92-6 (strany 11, 22)
16. LEXOVÁ P. a spol, Výskyt virových hepatitid v České republice – rok 2015 a trendy v posledních deseti letech [online]., (SZÚ, Praha) 2016; 25(6-7): 225–230. Dostupné z http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Hepatitidy/2015_trendy_vir_hep_v_CR.pdf
17. LOBOVSKÁ A. Praha 2001, Infekční nemoci, nakladatelství Karolinum, 263s., ISBN 80-246-01 16-8 (strana 197)
18. Mikrogen Diagnostik, recomLine HCV IgG (návod k použití). Dostupné z <https://www.mikrogen.de/english/products/product-overview/testsystem/hcv-igg.html>
19. NAVRÁTIL L. a spol, Praha 2017, Vnitřní lékařství pro nelékařské zdravotnické obory, nakladatelství Grada, 2. vydání, 2 562 str., ISBN 978-80-271-0210-6 (EPUB) (1 049 strana)
20. NAVRÁTIL L. a kolektiv, Praha 2017, Vnitřní lékařství pro nelékařské zdravotnické obory, nakladatelství Grada, 2. vydání, 2 562s. , ISBN 978-80-271-0210-5, (strana 2 227)
21. NEGRO F., Epidemiology of hepatitis C in Europe [online], Pages S158-S164, ISSN 1590-8658. Dostupné z <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0175525>
22. ROCHE, (Praha 26.07.2011), Tisková zpráva [online]. Dostupné z <https://www.roche.cz/cs/pro-media/tiskove-zpravy/26-7-2011.html>
23. SYNLAB CZECH s.r.o. (2020) SOP A. BM/SER 11– interný dokument. Anti HCV conf.
24. SYNLAB CZECH s.r.o. (2019) SOP T.BM 13 –interní dokument. Obsluha analyzátoru Architect i2000_{SR}
25. SYNLAB CZECH s.r.o. (2019) SOP A.BM/SER 04 HCV –interní dokument. Stanovení protilátek proti viru hepatitidy C (HCV) chemiluminiscenční imunoanalýzou (CMIA)
26. SYNLAB CZECH s.r.o. (2019) PLBM 07 –interní dokument. Interní potvrzení reaktivních vzorků anti-HCV.
27. SYNLAB CZECH s.r.o. (2012) ZPP.BM/SER 09 –interní dokument. HCV.
28. SYNLAB CZECH s.r.o. (2016) F.BM 051 – interní dokument. ELISA.

29. ŠPIČÁK J. a kolektiv, Praha 2017, Novinky v gastroenterologii a hepatologii II., nakladatelství Grada, 1. vydání, 320 stran, ISBN 978-80-271-0318-8, (strany 191, 192)
30. URBÁNEK P. a spol, Praha 2019, Klinická mikrobiologická a infekční lékařství, nakladatelství Trios, ISSN 1211-264X, (strany 48-76)
31. URBÁNEK P. a spol., Standardní diagnostický a terapeutický postup chronické infekce virem hepatitidy C (HCV) [online]. Dostupné z <https://www.csgh.info/cs/clanek/standardni-diagnosticky-a-terapeuticky-postup-chronicke-infekce-virem-hepatitidy-c-hcv-11012>
32. VITOUŠ A. Virová hepatitida typu C – diagnostika, terapie, prevence [online]. Dostupné z <https://www.internimedica.cz/pdfs/int/2010/06/13.pdf>
33. WHO, (1999), Hepatitis C—global prevalence [online]. Dostupné z https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/231001/WER7449_425-427.PDF
34. WHILKINS T. a spol, Hepatitis C: Diagnosis and Treatment [online]. Dostupné z <https://www.aafp.org/afp/2010/0601/afp20100601p1351.pdf>
35. ŽEMLIČKOVÁ H. a spol, Praha 2019, Praktikum lékařské mikrobiologie, nakladatelství Karolinum, 1.vydání, 52str., ISBN 978-80-246-4378-6 (strana 52)

9. Seznam obrázků

9.1. Seznam obrázků

Obrázek 1. Virus HCV (Mozorov, 2018)	7
Obrázek 2. Organizace genomu HCV (nahore) a struktura jednotlivých proteinů (dole) (Špičák).....	8
Obrázek 3. Následky infekce virem hepatitidy C (Chapel, 2018)	10
Obrázek 4. Faktory, které by mohly mít vliv na progresi jaterního postižení při chronické infekci HCV (Ehrmann).....	12
Obrázek 5. Zobrazení průběhu infekce od expozice na počet dní (100) (abbotdiagnostics)	14
Obrázek 6. Schéma ELISA metody (Bína P.)	16
Obrázek 7. Centrifuga (zdroj vlastní)	21
Obrázek 8. Preanalytická linka (zdroj vlastní).....	22
Obrázek 9. analyzátoru Architect i2000SR ABBOTT (zdroj vlastní).....	24
Obrázek 10. Reagencie Anti-HCV (zdroj vlastní).....	25
Obrázek 11. Kalibrátor Anti-HCV (zdroj vlastní).....	27
Obrázek 12. Kontroly Anti-HCV (zdroj vlastní).....	28
Obrázek 13. Konfirmační souprava ELISA pro stanovení protilátek anti-HCV (DIA.PRO).....	33
Obrázek 14. Reader of firmy DYNEX (zdroj vlastní).....	36
Obrázek 15. Strip s antigeny (zdroj RecomLine)	37
Obrázek 16. Souprava recomLine pro konfirmační stanovení protilátek anti-HCV (zdroj vlastní)	39
Obrázek 17. Blotter od firmy Dynex (zdroj vlastní).....	41
Obrázek 18. ELISA plán (zdroj vlastní)	43

Obrázek 19. Výsledkový list z readeru DYNEX (zdroj vlastní)	44
---	----

9.2. Seznam tabulek

Tabulka 1. Výsledek konfirmačního vyšetření	30
Tabulka 2. Pozice antigenů v jamkách	31
Tabulka 3. Rozmezí kontrol kvality	36
Tabulka 4. Hodnocení výsledků	37
Tabulka 5. Poloha rekombinantních antigenů na stripu	37
Tabulka 6. Návod k přípravě roztoků	40
Tabulka 7. Návod k ředění konjugátu.....	40
Tabulka 8. Hodnocení intenzity proužků.....	42
Tabulka 9. Hodnocení výsledků	42
Tabulka 10. Hodnocení pro kontroly kvality pro metodu ELISA	45
Tabulka 11. Hodnocení výsledků pro metodu ELISA.....	45
Tabulka 12. Výsledky měřených vzorků pomocí metody ELISA.....	52
Tabulka 13. Výsledky měřených vzorků pomocí imunoblotu RecomLine	52

10. Seznam zkratek

VHC – virus hepatitidy C

HIV – virus imunitní nedostatečnosti (human immunodeficiency virus)

HCC – hepatocelulární karcinom

DAA – přímo působící antivirotika (directly acting antivirals)

PCR – polymerázová řetězová reakce

Real-TM PCR – polymerázová řetězová reakce

RNA – ribonukleová kyselina

EDTA – odebraná nesrážlivá krev (kyselina etylen-diamino-tetraoctová)

NK – negativní kontrola

PK – pozitivní kontrola

VŠS – odborný vysokoškolský pracovník

CMIA – chemiluminiscenční imunoanalýza

AMK – aminokyseliny

ORF – otevřený čtecí rámeček

HBV – virus hepatitidy B

ALT – alaninaminotransferáza

EIA – enzymová imunoanalýza

anti – HCV – protilátky proti viru hepatitidy C

RBV – ribavirin (lék)

PEG-IFN – pegylovaný interferon alfa (lék)

LIS – laboratorní informační systém

IHK – interní hodnocení kvality

EHK – externí hodnocení kvality

IgG – imunoglobuliny (protilátky) třídy G

IgM – imunoglobuliny (protilátky) třídy M

ČLS JEP – Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně

WHO –světovná zdravotnická organizace