

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS  
MEDICINOS AKADEMIJA  
MEDICINOS FAKULTETAS  
LABORATORINĖS MEDICINOS BIOLOGIJA  
ANTROS PAKOPOS STUDIJOS

Eglė Dovydaitytė

**HEPATITO C VIREMIJA IR GENOTIPŲ DAŽNIS TIRIAMŲJŲ POPULIACIJOJE**

Baigiamasis magistro darbas

**Darbo vadovas**  
Prof. dr. Astra Vitkauskienė

Kaunas, 2020 m.

# TURINYS

|                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| SANTRAUKA .....                                                                     | 4  |
| SUMMARY .....                                                                       | 5  |
| INTERESŲ KONFLIKTAS .....                                                           | 6  |
| ETIKOS KOMITETO LEIDIMAS.....                                                       | 6  |
| SANTRUMPOS .....                                                                    | 7  |
| ĮVADAS.....                                                                         | 8  |
| DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI.....                                                    | 9  |
| 1. LITERATŪROS APŽVALGA.....                                                        | 10 |
| 1.1. Hepatito C viruso sandara.....                                                 | 10 |
| 1.2. Hepatito C epidemiologija.....                                                 | 10 |
| 1.3. Hepatito C perdavimo būdai ir rizikos veiksniai .....                          | 12 |
| 1.4. Hepatito C klinikinė išraiška .....                                            | 13 |
| 1.5. HCV viremija .....                                                             | 14 |
| 1.6. HCV genotipai ir subtipai.....                                                 | 15 |
| 1.7. Hepatito C laboratorinė diagnostika .....                                      | 17 |
| 1.7.1. Hepatito C viruso RNR nustatymas .....                                       | 18 |
| 1.7.2. Hepatito C viruso genotipo nustatymas .....                                  | 19 |
| 2. TYRIMO METODIKA .....                                                            | 21 |
| 2.1. Tyrimo eiga ir tiriamųjų atranka.....                                          | 21 |
| 2.2. Viremijos nustatymas <i>in vitro</i> nukleorūgščių amplifikacijos tyrimu ..... | 21 |
| 2.2.1. Ėminiai ir tiriamųjų mėginių paruošimas .....                                | 21 |
| 2.2.2. Reagentai.....                                                               | 21 |
| 2.2.3. Tyrimo principas .....                                                       | 22 |
| 2.2.4. Darbo eiga .....                                                             | 22 |
| 2.2.5. Rezultatų vertinimas .....                                                   | 23 |
| 2.3. HCV amplifikacija genotipui nustatyti.....                                     | 24 |
| 2.3.1. Tiriamųjų mėginių ruošimas .....                                             | 24 |
| 2.3.2. Reagentai.....                                                               | 24 |
| 2.3.3. Tyrimo principas.....                                                        | 25 |
| 2.3.4. Darbo eiga .....                                                             | 25 |
| 2.4. HCV genotipo nustatymas atvirkštinės hibridizacijos principu .....             | 26 |
| 2.4.1. Tiriamųjų mėginių ruošimas .....                                             | 26 |
| 2.4.2. Reagentai.....                                                               | 26 |
| 2.4.3. Tyrimo principas .....                                                       | 26 |

|                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.4.4. Darbo eiga.....                                                                   | 27 |
| 2.4.5. Rezultatų vertinimas .....                                                        | 28 |
| 2.5. Statistinė duomenų analizė .....                                                    | 28 |
| 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....                                                      | 29 |
| 3.1. HCV viremija tiriamųjų populiacijoje.....                                           | 29 |
| 3.2. HCV genotipų dažniai tiriamųjų populiacijoje.....                                   | 30 |
| 3.3. HCV viremijos ir genotipų tarpusavio priklausomumas tiriamųjų populiacijoje.....    | 31 |
| 3.4. HCV viremija tiriamųjų populiacijoje priklausomai nuo lyties ir amžiaus.....        | 33 |
| 3.5. HCV genotipų dažnis tiriamųjų populiacijoje priklausomai nuo lyties ir amžiaus..... | 35 |
| 3.6. Tyrimo rezultatų apibendrinimas.....                                                | 39 |
| IŠVADOS.....                                                                             | 42 |
| LITERATŪROS SĄRAŠAS.....                                                                 | 43 |
| PRIEDAI .....                                                                            | 50 |

# SANTRAUKA

**Magistro darbo autorius:** Eglė Dovydaitytė

**Magistro darbo pavadinimas:** Hepatito C viremija ir genotipų dažnis tiriamųjų populiacijoje.

**Darbo tikslas:** įvertinti hepatito C viremiją ir genotipų dažnį tiriamųjų populiacijoje.

**Tyrimo uždaviniai:** 1. Nustatyti hepatito C viremiją tiriamųjų populiacijoje. 2. Nustatyti hepatito C genotipų dažnį tiriamųjų populiacijoje. 3. Įvertinti hepatito C viremiją ir genotipų dažnį tiriamųjų populiacijoje atsižvelgiant į tiriamųjų lytį ir amžių.

**Tyrimo objektas ir metodai.** Retrospektyviai analizuoti 2018 metais LSMU Laboratorinės medicinos klinikoje dėl hepatito C tirtų pacientų duomenys. Atrinkti pacientai su nustatyta HCV viremija ir genotipu. HCV viremijai nukleorūgščių amplifikacijos metodu aptikti buvo naudojami „artus HCV QS-RGQ Kit“ (QIAGEN, Vokietija) reagentų rinkiniai, „QIASymphony® AS/SP“ (QIAGEN, Vokietija) analizatoriai ir „Rotor Gene® Q“ (QIAGEN, Vokietija) termocikleris. Genotipo nustatymui naudoti „GeneAmp® PCR System 9700“ (Applied Biosystems, JAV) termocikleris ir „VERSANT® HCV Amplification 2.0 Kit (LiPA)“ (Siemens Healthineers, Vokietija) reagentų rinkiniai.

**Rezultatai.** Iš 200 tiriamųjų, 59 proc. sudarė vyrai ir 41 proc. moterys. Vyriausias pacientas buvo 86 metų, jauniausias – 22 metų amžiaus, o populiacijos amžiaus vidurkis buvo 51,4 metai. Tiriamųjų populiacijoje vyravo (77,5 proc.) didelę ( $>6,0 \times 10^5$  TV/ml) viremiją turintys pacientai. Dažniausiai (63,5 proc.) aptinkamas buvo 1 genotipas, rečiau (30 proc.) 3 genotipas, o rečiausiai (6,5 proc.) – 2 genotipas. Tarp 1 ir 3 genotipus turinčių pacientų reikšmingai ( $p=0,008$  ir  $p=0,016$ ) daugiau nustatyta didelės viremijos atvejų. Pirminės viremijos vidurkis buvo didesnis ( $p=0,026$ ) vyrų grupėje, o tarp amžiaus grupių statistiškai reikšmingai nesiskyrė. 3 genotipą turintys tiriamieji buvo statistiškai reikšmingai ( $p=0,011$ ) jaunesni nei turintys kitus genotipus.

**Išvados:** 1. Nustatytas pirminės viremijos vidurkis tiriamųjų populiacijoje –  $6,9 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^7$  TV/ml. 55 proc. daugiau tiriamųjų turėjo didelę viremiją. 2. Tiriamųjų populiacijoje 63,5 proc. nustatyta HCV 1 genotipų, perpus mažiau – 3 genotipų, mažiausiai – 2 genotipų. Dažniausi HCV genotipai/subtipai buvo 1b, apimantis daugiau nei trečdalį populiacijos, 3a, 1a/1b, 1, o rečiausi buvo 2a/2c, 1a, 2b ir 2. 3. Statistiškai reikšmingai didesnis pirminės viremijos vidurkis nustatytas vyrams, nepriklausomai nuo amžiaus. Tiriamųjų populiacijoje nustatytų HCV genotipų/subtipų dažnis skyrėsi priklausomai nuo lyties (daugiau 1 genotipo vyrų, 1b subtipo moterų). Genotipų dažnių pasiskirstymas priklausė nuo amžiaus grupių, 3 genotipas buvo nustatomas jaunesniems tiriamiesiems.

## SUMMARY

**Author of a master's thesis.** Eglė Dovydaitytė

**The title of the master's thesis.** Hepatitis C Viremia and Genotype Frequency in the Study Population.

**The aim:** to evaluate hepatitis C viremia and genotype frequency in the study population.

**Objectives:** 1. To determine hepatitis C viremia in the study population. 2. To determine hepatitis C genotype frequency in the study population. 3. To evaluate hepatitis C viremia and genotype frequency in the study population in relation to gender and age of subjects.

**Study subjects and methods:** Retrospectively analyzed data from patients tested for hepatitis C at Clinic of Laboratory Medicine of Lithuanian University of Health Sciences (LSMU). Patients with detected HCV viremia and genotype were selected. „artus HCV QS-RGQ Kit“ (QIAGEN, Germany) reagent kits, „QIAasymphony® AS/SP“ (QIAGEN, Germany) analyzers and „Rotor Gene® Q“ (QIAGEN, Germany) thermocycler were used to detect HCV viremia by nucleic acid amplification. „GeneAmp® PCR System 9700“ (Applied Biosystems, USA) thermocycler and „VERSANT® HCV Amplification 2.0 Kit (LiPA)“ (Siemens Healthineers, Germany) reagent kits were used for genotyping.

**Results:** Of the 200 subjects, 59% were men and 41 % women. The oldest patient was 86 years, the youngest 22 yearsold , and the mean of population age was 51.4 years. In the study population high viraemia ( $>6,0 \times 10^5$  IU/ml) was predominant (77.5%). Genotype 1 was the most common (63.5%), genotype 3 was less frequent (30%), and genotype 2 was the rarest (6.5%). Significantly ( $p=0.008$  and  $p=0.016$ ) more cases of primary viremia were observed among patients with genotypes 1 and 3. The mean primary viremia was higher ( $p=0.026$ ) in the male group and did not differ statistically significantly between age groups. Subjects with genotype 3 were statistically significantly ( $p=0.011$ ) younger than those with other genotypes.

**Conclusions:** 1. The mean most popular primary viremia was  $6.9 \times 10^6 \pm 1.1 \times 10^7$  IU/ml. 55 % more subjects with large viremias. 2. In the study population 63,5 % were HCV 1 genotype, half less 3 genotype, at least 2 genotype. The most HCV genotypes/subtypes were 1b, covering more than a third of the population, 3a, 1a/1b, 1, and the rarest were 2a/2c, 1a, 2b and 2. 3. There is a statistically significant increase in mean primary viremia in men regardless of age. The frequency of HCV genotypes/subtypes identified in the study population differ by gender (more 1 genotype were male, 1b subtype - female). Difference of genotype frequency depend on age groups, 3 genotypes were identified in younger subjects.

## **INTERESŲ KONFLIKTAS**

Autoriui interesų konflikto nebuvo.

## **ETIKOS KOMITETO LEIDIMAS**

Magistro baigiamajam darbui atlikti gautas LSMU Bioetikos centro leidimas 2019-03-08  
Nr. BEC-LMB(M)-339 (1 priedas).

## SANTRUMPOS

|          |   |                                                                                                 |
|----------|---|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AIDS     | – | (angl. <i>acquired immune deficiency syndrome</i> ) – įgytasis imuninio nepakankamumo sindromas |
| ALT      | – | alaninė transaminazė                                                                            |
| AT-PGR   | – | atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininė reakcija                                     |
| GT       | – | genotipas                                                                                       |
| HCV      | – | hepatito C virusas                                                                              |
| kDNR     | – | komplementari DNR                                                                               |
| LSMU     | – | Lietuvos sveikatos mokslų universitetas                                                         |
| OR       | – | (angl. <i>odds ratio</i> ) – galimybių santykis                                                 |
| PGR      | – | polimerazės grandininė reakcija                                                                 |
| proc.    | – | procentai                                                                                       |
| PSO      | – | Pasaulio sveikatos organizacija                                                                 |
| QS       | – | (angl. <i>quantification standard</i> ) – kiekybinio nustatymo standartas                       |
| RNR      | – | ribonukleino rūgštis                                                                            |
| SD       | – | (angl. <i>standard deviation</i> ) – standartinis nuokrypis                                     |
| ULAC     | – | Užkrečiamų ligų ir AIDS centras                                                                 |
| ŽIV      | – | žmogaus imunodeficito virusas                                                                   |
| $\chi^2$ | – | Chi kvadrato kriterijus                                                                         |

## IVADAS

Hepatitis C – tai lėtinė kepenų liga, kurią sukelia mažas, turintis apvalkalą, viengrandės RNR virusas, vadinamas hepatito C virusu (HCV) [1]. Pacientams, sergantiems lėtine HCV infekcija, dažnai liga gali progresuoti į kepenų cirozę, dėl kurios padidėja hepatoceliulinės karcinomos rizika [2]. Nustatyta, jog apie 3 proc. pasaulio populiacijos yra infekuoti HCV, 170 mln. gyventojų turi HCV infekciją, kasmet dėl hepatito sukeltų kepenų sutrikimų miršta nuo 350 tūkst. iki 500 tūkst. žmonių [3]. Kasmet užfiksuojami 3–4 milijonai naujų HCV infekcijos atvejų. Dėl nuolat didėjančio virusu užkrėstų pacientų skaičiaus, Pasaulio sveikatos organizacija (PSO) pripažino hepatitą C vieną rimčiausių pasaulinės sveikatos problemų. 2016 metais PSO priėmė visuotinę strategiją, jog iki 2030 metų virusinis hepatitis būtų pašalintas kaip visuomenės sveikatos grėsmė.

HCV perdavimo būdai yra per kraują, lytinis ir iš motinos vaikui, tačiau pagrindinis perdavimo būdas yra per kraują, kaip pavyzdžiui, dalijantis injekcijos priemonėmis, perpilant kontaminuotą kraują ar jo produktus, atliekant tatuiruotes ir kitas procedūras [4].

PSO duomenimis, ūminė HCV infekcija dažniausiai yra besimptomė ir retai siejama su pavojinga gyvybei liga. Apie 15-45 proc. infekuotų asmenų virusas pasišalina spontaniškai per šešis mėnesius be gydymo, o likusiems 55-85 proc. išsivysto lėtinė infekcija. Kepenų cirozės išsivystymo rizika asmenims, turintiems lėtinę HCV infekciją, yra 15-30 proc. per 20 metų.

Europos ligų prevencijos ir kontrolės centro duomenimis, hepatitis C dažniau pasireiškia vyrams nei moterims, santykiu 1,6:1. Daugiausia HCV infekcija paveiktų asmenų tarp vyrų yra 35-44 metų amžiaus, o moterų – tarp 25-34 metų.

Ūmaus ir lėtinio hepatito C infekcijos diagnostika yra paremta HCV RNR aptikimu, t.y. viremijos nustatymu. Žinios apie HCV viremiją leidžia nustatyti HCV pasišalinimo tempą ir galimybę būti aktyviu infekcijos nešiotu populiacijoje [5].

Šiuo metu HCV klasifikuojamas į 11 genotipų, šeši iš jų yra pagrindiniai (nuo 1 iki 6), toliau genotipai skirstomi į subtipus [6]. HCV genotipai turi ryškų geografinį ir epidemiologinį pasiskirstymą ir genotipo identifikavimas yra kliniškai svarbus, pritaikant gydymo dozes ir trukmę, dėl skirtingų atsakų į gydymą bei atitinkamai savitų terapinių požiūrių reikalingų kiekvienam genotipui [7].

Genotipo nustatymas ir viremijos įvertinimas yra vienodai svarbūs kuriant gydymo strategijas ir prognozuojant gydymo rezultatus tarp HCV infekuotų pacientų [8]. Atliktame tyrime siekiama įvertinti populiacijos HCV viremiją ir genotipus, bei jų pasiskirstymą pagal lytį ir amžių.

# DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

**Darbo tikslas:** įvertinti hepatito C viremiją ir genotipų dažnį tiriamųjų populiacijoje.

**Darbo uždaviniai:**

1. Nustatyti hepatito C viremiją tiriamųjų populiacijoje.
2. Nustatyti hepatito C genotipų dažnį tiriamųjų populiacijoje.
3. Įvertinti hepatito C viremiją ir genotipų dažnį tiriamųjų populiacijoje atsižvelgiant į tiriamųjų lytį ir amžių.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Hepatito C viruso sandara

HCV yra mažas (60-80 nm), RNR virusas, priklausantis *Flaviviridae* šeimai, *Hepacivirus* genčiai, sukeliantis ūmias ir lėtines kepenų ligas, įskaitant lėtinį hepatitą, kepenų cirozę ir hepatoceliulinę karcinomą [9]. HCV sudarytas iš vienvijos RNR grandinės. HCV genomą sudaro 9600 nukleotidų. Genomas turi vieną atvirą skaitymo rėmelį (angl. *Open reading frame*), apytiksliai 9000 nukleotidų ilgio, kuris yra sujungtas su 5' ir 3' netransliuojamais regionais (angl. *Untranslated regions (UTR)*), svarbiais viruso replikacijai ir transliacijai [10]. Priklausomai nuo genotipo, atviras skaitymo rėmelis gali būti sudarytas iš 9030-9099 nukleotidų ir koduoja 3010-3033 aminorūgščių poliproteino prekursorių. HCV atviro skaitymo rėmelio transliacijos metu produkuojamas poliproteinas, kuris viruso proteazių yra suskaidomas į struktūrinius baltymus: šerdinį (angl. *core*) ir apvalkalo glikoproteinus E1 bei E2, dalyvaujančius virusinių dalelių gamyboje, bei septynis nestruktūrinius baltymus, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A ir NS5B [11]. HCV šerdinis baltymas yra viruso nukleokapsidės baltymas, turintis daug funkcijų, įskaitant RNR prisijungimo, imuninės moduliacijos, ląstelių signalizacijos, onkogeninio potencialo ir autofagijos [12]. Apvalkalo glikoproteinai (E1 ir E2) yra vyraujantys struktūrinių baltymų komponentai, padedantys virusui patekti į šeimininko ląstelę [1413].

Viruso genomine RNR yra susieta su šerdiniu baltymu ir suformuoja nukleokapsidę, kuri yra sferinė ir maždaug 30 nm diametro. Infekcinį virioną sudaro nukleokapsidė, apsupta lipidų turinčiu apvalkalu, kilusiu iš šeimininko endoplazminio tinklo membranų [14].

HCV genomine RNR yra fiziškai kompaktiška ir labai struktūrizuota. Šios savybės palengvina nuolatinę HCV infekcijų buvimą žmonėse, apsaugodamos genomą nuo degradacijos pasitelkiant įgimtą antivirusinę gynybą [15].

## 1.2. Hepatito C epidemiologija

PSO duomenimis maždaug 71 mln. gyventojų visame pasaulyje turi lėtinę HCV infekciją. Hepatito C paplitimas visame pasaulyje labai varijuoja, kadangi atlikti tikslius skaičiavimus trukdo aukšti nediagnozuotų ligos atvejų rodikliai ir tinkamo duomenų rinkimo stoka [16]. Globaliai 130-150 milijonų žmonių turi lėtinę HCV infekciją, iš kurių 80 milijonų užsikrėtę lėtine virusine infekcija [17]. Apie 3-4 milijonai žmonių pasaulyje kasmet yra naujai infekuojami HCV, o apie 350 000 pacientų miršta dėl hepatito C sukeltų kepenų sutrikimų [18].

Labiausiai HCV paplitęs (>3,5 proc.) Rytų Azijoje, Šiaurės Afrikoje ir Vidurio Rytų regionuose. Išsivysčiusiose šalyse kaip Jungtinės Valstijos (1,8 proc.), Vokietija (0,6 proc.), Kanada (0,8

proc.), Prancūzija (1,1 proc.) ir Australija (1,1 proc.) HCV paplitęs mažiau, palyginti su Rytų Azija ar Šiaurės Afrika. Kinijoje ir Indijoje, turinčiose didesnį gyventojų skaičių, paplitimas yra atitinkamai 3,2 proc. ir 0,9 proc. [3]. Pagal 2016 metų tyrimo duomenis, mažiausiai HCV paplitęs Vakarų Europoje (0,9 proc.) (išskyrus kai kurias kaimo vietas Pietų Italijoje ir Graikijoje), o labiausiai – Centrinėje Europoje (3,1 proc.), ypač Rumunijoje ir Rusijoje [19].

Įvertinus bendrą HCV RNR teigiamų infekcijų skaičių, buvo nustatyta, jog globalus vidutinis viremijos dažnis yra 67 proc. (118,9 milijonai HCV RNR teigiamų atvejų), svyruojant nuo 48,7 proc. Centrinėje Azijoje iki 80,2 proc. Lotynų Amerikoje (atogrąžų regione); anti-HCV paplitimas Europoje yra apie 1,8 proc. (daugiau nei 13 milijonų atvejų), vidutinis HCV viremijos dažnis – 72,4 proc. (beveik 10 milijonų HCV RNR teigiamų atvejų) [20].

Užkrečiamų ligų ir AIDS centro (ULAC) duomenimis, Lietuvoje 2018 m. užregistruoti 25 ūminio hepatito C atvejai. Nuo 2001 m. Lietuvoje stebima sergamumo ūminiu HCV mažėjimo tendencija: nuo 5,4 atv./100 tūkst. gyventojų 2001 m. iki 0,9 atv./100 tūkst. gyventojų 2018 m. Liakinos ir Valantino atlikto tyrimo [21] duomenimis, Lietuvoje anti-HCV paplitimas yra 2,8 proc. HCV infekcija labiau paplitusi tarp vyrų (4,02 proc. vyrų, 1,49 proc. moterų,  $p=0,003$ ) ir nepriklausomai nuo tiriamųjų amžiaus. Didesni infekcijos rodikliai aptikti Vilniaus ir Kauno regionuose, nei mažesnėse kaimo vietovėse.

Virusinio hepatito C infekcija dažnesnė vyrams nei moterims, kadangi moterims labiau būdingas spontaniškas viruso pasišalinimas ir lėtesnis kepenų pažeidimo progresavimo tempas. JAV aptinkamas HCV antikūnų paplitimas tarp vyrų yra beveik dvigubai didesnis nei tarp moterų (2,1 proc. vyrų, 1,1 proc. moterų), didesnis paplitimas tarp vyrų pastebimas ir Europoje [22]. HCV atvejų pasiskirstymas Lietuvoje pagal lytį 2018 metais: vyrai – 40,0 proc., moterys – 60,0 proc. Moterų sergamumas ūminiu HCV buvo nežymiai didesnis už vyrų – atitinkamai 1 atv. ir 0,8 atv./100 tūkst. gyventojų.

HCV paplitimo augimas stebimas kartu su didėjančiu amžiumi, iki maksimalaus paplitimo 55-64 metų asmenų grupėje [23]. Pagal ULAC duomenis, Lietuvoje 2018 m. daugiau nei pusė (56 proc.) ūminio HCV atvejų nustatyta 45-64 m. ir vyresnių asmenų amžiaus grupėje. Didžiausias sergamumas užregistruotas 18-24 ir 25-34 m. amžiaus asmenų grupėse – 1,3 atv./100 tūkst. gyventojų. Didžiausias vyrų sergamumas (2,6 atv./100 tūkst. gyv.) nustatytas 18-24 m. amžiaus grupėje, o moterų (2,4 atv./100 tūkst. gyv.) – 45-54 m. amžiaus grupėje.

Epidemiologinis HCV infekcijos paplitimo visame pasaulyje vertinimas buvo veiksmingas užkertant kelią ligai plisti ir gydant užsikrėtusius pacientus. Šis vertinimas taip pat veiksmingas kontroliuojant galimą būsimą HCV perdavimą [3].

### 1.3. Hepatito C perdavimo būdai ir rizikos veiksniai

HCV dažniausiai perduodamas per kraują ar jo produktus, tačiau infekcijos paplitimo keliai gali skirtis. Jatrogeniniai perdavimo būdai: kraujo perpylimas naudojant neištirtus produktus, krešėjimo faktorių ar kitų kraujo produktų transfuzija, organo transplantacija, invazinėms procedūroms skirtų medicininių instrumentų daugkartinis naudojimas, hemodializė, endoskopija, intraveninių narkotikų vartojimas [24]. HCV taip pat gali būti perduodamas lytiniu būdu ir vertikaliai, nuo užkrėstos motinos naujagimiui, tačiau šie perdavimo būdai yra žymiai retesni [25]. HCV infekcijos perdavimas lytiniu būdu didėja tarpe žmonių, turinčių kelis seksualinius partnerius, taip pat koinfekcija ŽIV gali padidinti perdavimo rodiklį [3]. Perinatalinis perdavimas iš HCV infekuotų motinų savo naujagimiams turi ribotą epidemiologinį vaidmenį, kadangi tai pasireiškia mažiau nei 5 proc. atvejų, paplitimas padidėja esant HCV/ŽIV koinfekcijai [26]. Cezario pjūvio procedūra nedidina HCV infekcijos dažnio [3].

Liakinos ir Valantino atlikto tyrimo [21] duomenimis, Lietuvoje HCV infekcija plinta daugiausiai naudojant intraveninius narkotikus ( $OR=42,5$ ,  $p<0,0001$ ). HCV perdavimas vyksta atliekant kraujo transfuzijas ( $OR=6,4$ ,  $p=0,0002$ ), dantų šalinimo procedūras ( $OR=4,1$ ,  $p=0,0048$ ), daugybines ir ilgalaikes hospitalizacijas ( $OR=3,0$ ,  $p=0,0064$ ), gimdymo metu ( $OR=5,0$ ,  $p=0,00224$ ), darant tatuiruotes ( $OR=4,4$ ,  $p=0,0013$ ), atvirų traumų atvejais ( $OR=3,7$ ,  $p=0,0009$ ). Pagal ULAC duomenis, 2010 metais Lietuvoje 56,1 proc. hepatito C atvejų užsikrėtimo kelias buvo nežinomas, 14,6 proc. – lytinis kontaktas su sergančiuoju, 12,3 proc. – švirkščiamųjų narkotikų vartojimas.

Lietuvoje, kaip ir visame pasaulyje, užsikrėtimo HCV priežastis dažniausiai lieka neaiški. HCV perdavimo būdus yra sudėtinga nustatyti dėl kelių priežasčių: dėl ilgo inkubacinio periodo sunku sutapatinti susijusius atvejus su bendru infekcijos šaltiniu, be to, ūmios HCV infekcijos dažniausiai būna besimptomės, kas sukelia sunkumus identifikuojant užsikrėtimo būdą [27].

Tikimybę užsikrėsti HCV didina: intraveninių narkotikų naudojimas, kraujo transfuzijos, organų transplantacijos, hemodializės, atliktos iki 1992 m., atsitiktinis kontaktas su užkrėsta adata tarp medicinos darbuotojų, infekuotumas ŽIV [27]. Kiti HCV rizikos veiksniai yra ligos, kaip pavyzdžiui, kito tipo hepatitas, diabetas, lytiškai perduodamos ligos; pavojinga socialinė elgsena, tokia kaip įkalinimas, antisanitarinis tatuiruočių atlikimas; šeiminė ligos istorija [28].

Dauguma pacientų, turinčių hepatito C infekciją, negali išsivalyti nuo viruso ir ši būklė progresuoja iki lėtinės infekcijos. Šis rodiklis didesnis pacientams, užsikrėtusiems ŽIV, ir mažesnis moterims bei vaikams [29]. Atlikti tyrimai parodė, jog tokie sociodemografiniai požymiai kaip amžius, lytis ir migracija turi didelę įtaką HCV infekcijos progresavimui [28]. Nepalankūs veiksniai, nulemiantys lėtinės kepenų ligos progresavimą, yra vyresnis ligonio amžius (40 metų ir daugiau), vyriška lytis, didelė viruso koncentracija kraujyje, lėtinis alkoholizmas, koinfekcija su hepatito B virusu ir koinfekcija su ŽIV, nutukimas [30].

HCV perdavimo būdo atpažinimas yra labai svarbus tolimesniems tyrimams, skirtiems užkirsti kelią virusų plitimui. Svarbu ir tai, jog perdavimo spartos skirtumai sudaro sąlygas išskirtiniam HCV paplitimui ir genotipų pasiskirstymui pasaulyje [27].

#### **1.4. Hepatito C klinikinė išraiška**

Po pirminės HCV infekcijos apie 80 proc. užkrėstųjų nepasireiškia jokie simptomai. Tiems, kuriems simptomai atsiranda, gali pasireikšti karščiavimas, nuovargis, sumažėjęs apetitas, pykinimas, vėmimas, pilvo skausmas, tamsūs šlapimas, pilkos spalvos išmatos, sąnarių skausmas ir gelta [18].

HCV infekcija yra ūminės arba lėtinės formos, lėtinės HCV infekcijos inkubacinis laikotarpis gali trukti nuo 14 iki 180 dienų [4]. Ūminė virusinio hepatito C fazė tęsiasi iki šešių mėnesių ir dažniausiai pacientams nepasireiškia konkretūs simptomai. 70-80 proc. pacientų HCV infekcija pereina į lėtinę fazę, kurioje pasireiškia simptomai – gelta (40 proc.), nuovargis (80 proc.), pilvo skausmai (50 proc.), dispepsija (40 proc.) [30].

Mokslininkės S. Knighton ištirta, jog pacientams, pasireiškusiais infekcijos simptomais, ūmioje fazėje, yra labiau tikėtinas spontaniškas viruso pašalinimas. Nors šių pacientų organizme jau bus pasigaminę antikūnai prieš HCV, jiems nėra reikalingas farmakologinis gydymas ir neturėtų likti ilgalaikių komplikacijų. Ūminė HCV infekcija retai išsivysto į kepenų ligą ar kepenų funkcijos nepakankamumą [31].

Nuolatinis lėtinis kepenų ląstelių (hepatocitų) uždegimas gali sukelti fibrozę, o nepastovi hepatocitų regeneracija sukelia mažų mazgelių formavimąsi, kuris suardo kepenų architektūrą, t.y. išsivysto cirozė. Per 20-25 metų periodą cirozė išsivysto maždaug 20 proc. pacientų ir cirozės sukeltos komplikacijos yra pagrindinė su HCV infekcija susijusios mirties priežastis. Lėtinė HCV infekcija, manoma, yra atsakinga už 50-76 proc. visų kepenų vėžinių susirgimų ir yra pagrindinė kepenų transplantacijos priežastis Europoje ir Šiaurės Amerikoje [31].

Lėtinio VHC progresavimas iki kepenų cirozės labai priklauso nuo pacientų amžiaus: 5 proc. <40 metų amžiaus ir 20 proc. >40 metų amžiaus pacientų liga progresuoja iki cirozės mažiau nei per 20 metų [32]. HCV infekcija vaikams rodo didėjančią vėlyvosios stadijos kepenų ligos riziką vyresniame amžiuje [17].

Moterims labiau būdingas spontaniškas viruso pašalinimas ir joms būdingas mažesnis ligos progresavimas, jei infekcija yra lėtinė. Kadangi moterų ligos progresavimo greitis lėtesnis, HCV sukeltos ligos komplikacijos labiau paveikia vyrus. Davis ir kt. atlikto tyrimo [22] metu ištirta, jog apie 74 proc. cirozės atvejų nustatoma vyrams ir šie atvejai per pastaruosius 20 metų ir toliau sudarys daugumą.

## 1.5. HCV viremija

HCV viremija yra apibūdinama kaip nuolatinis HCV RNR buvimas HCV paveiktuose individuose. Duomenys apie HCV viremiją leidžia nusakyti HCV pašalinimo tempą ir tikėtinumą būti aktyviu infekcijos nešiotju duotoje populiacijoje [5]. Norint nustatyti HCV viremijos lygį kraujyje, polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu atliekama HCV RNR kiekybinė analizė [33].

HCV RNR gali būti aptinkamas ūmios fazės metu, nors jos lygiai gali labai skirtis ir gali atsirasti intarpų (iki kelių savaičių) su nenustatoma HCV RNR. Dėl šios priežasties HCV RNR neigiami asmenys turi būti pakartotinai tiriami po 12 ir 24 savaičių, jog būtų patvirtinamas galutinis viruso pašalinimas [34]. HCV pašalinimo rodiklis parodo proporciją HCV infekuotų asmenų, kuriems infekcija spontaniškai pašalinama po ūmios infekcijos stadijos [35].

HCV RNR lygio dinamika po HCV poveikio parodo pradinę „prieš padidėjimą“ (angl. *pre-ramp-up*) fazę su kintančia žemo lygio viremija (nuo atsiradimo iki pradinės kiekybiškai įvertinamos HCV RNR), sekančią „padidėjimo“ (angl. *ramp-up*) fazę su eksponentiniu HCV RNR kiekio padidėjimu (8-10 dienos) ir aukštos viremijos stabilizavimosi fazę (45-68 dienos) [36]. Nustatyti trys galimi viremijos modeliai, turintys klinikinės reikšmės: trumpalaikė viremija, lydima ūmaus hepatito, nuolatinė viremija, progresuojanti iki lėtinio proceso, ir protarpinė viremija, kuriai būdingas pradinis HCV RNR praradimas, tačiau kuri pasikartoja po kelių mėnesių [37].

Didžiausia HCV viremija aptinkama ūmios infekcijos metu, ypač infekcijos periode, kai neaptinkama HCV antikūnų [38]. Didžiausia viremija kraujyje nustatoma alanininės transaminazės (ALT) padidėjimo metu, tačiau HCV RNR viremija gali būti esant normaliam ALT aktyvumui [5]. Pagal LR Sveikatos ministro įsakymą, hepatito C didelė viremija yra kai HCV RNR kopijų kiekis kraujo serume lygus 600 000 TV/ml arba daugiau, o maža – kai HCV RNR kopijų kiekis kraujo serume mažesnis negu 600 000 TV/ml [33].

Populiacijoje, chroniškai infekuotų individų (HCV antikūnai teigiami ir RNR teigiama) dalis iš visų kada nors infekuotų individų (HCV antikūnai teigiami, nepaisant HCV RNR būsenos), sudaro HCV vireminį dažnį šiai populiacijai [39]. Cirkuliuojančios HCV RNR kiekis paciento plazmoje ar serume yra vadinamas viruso titru ir spėjama atspindi viruso replikacijos bei pašalinimo iš šeimininko greitį [40].

Noh su bedraautorais [41] aptiko didesnę hepatoceliulinės karcinomos išsivystymo riziką pacientams, kuriems nustatytas didelis HCV RNR titras, nei kurių titras mažas. Nustatyta, jog reikšmingai didesnę HCV viremiją turi HCV/ŽIV koinfekuoti pacientai, lyginant su infekuotais tik HCV infekcija [42].

Atlikti tyrimai parodė, jog HCV RNR kopijų skaičius pacientams, sergantiems hepatitu C, nekoreliuoja su amžiumi ar lytimi [43]. HCV infekcijos vireminis dažnis nesiskiria priklausomai nuo amžiaus ar lyties [5].

Ilgalaikis virusologinis atsakas (angl. *SVR – sustained virological response*) pacientams, sergantiems lėtiniu hepatitu C, apibrėžiamas kaip nenustatomas HCV RNR serume tiriant po 24 savaičių nuo gydymo pabaigos [44].

## 1.6. HCV genotipai ir subtipai

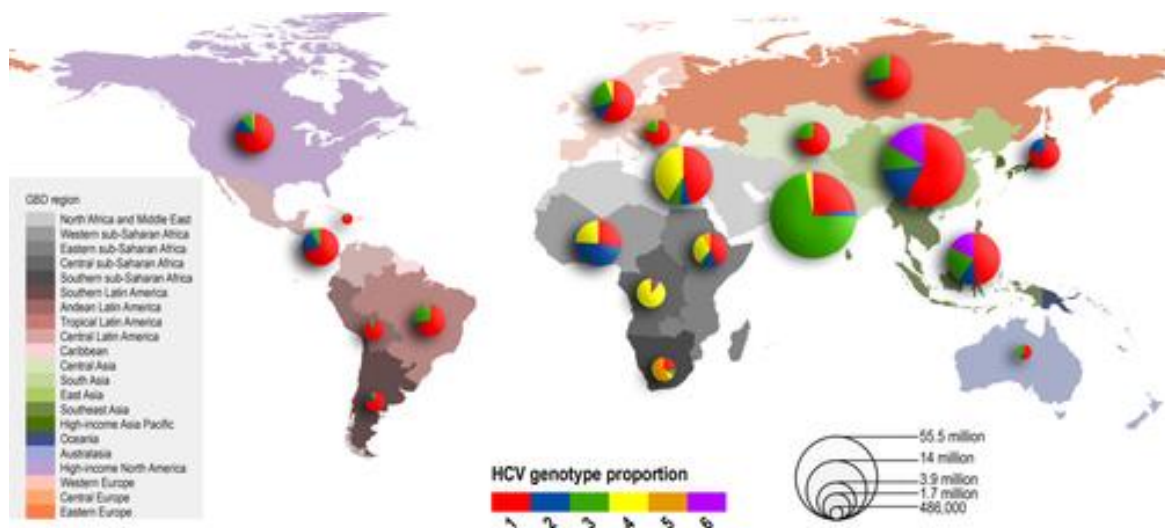
Pasaulyje iš viso nustatyta 11 HCV genotipų ir daugiau nei 90 subtipų [11]. Pagal PSO, HCV turi 6 pagrindinius genotipus, sukeliančius HCV infekciją. HCV klasifikuojamas į genotipus, kurie skiriasi tarpusavyje apie 25-35 proc. nukleotidų lygmenyje. Toliau HCV genotipai suskirstomi į subtipus, kurie skiriasi vienas nuo kito apie 15-25 proc. nukleotidų lygmenyje [45].

HCV genotipas turi didelę klinikinę svarbą santykyje su klinikinėmis ligos apraiškomis ir atsaku į gydymą [46]. Pagal naujausias Europos kepenų tyrimų asociacijos (angl. *EASL*) rekomendacijas, HCV infekcijos gydymas labai priklauso nuo konkretaus HCV genotipo ar subtipo [47]. 2018 metų PSO pacientų, sergančių lėtine HCV infekcija, atrankos, priežiūros ir gydymo gairėse rekomenduojama nustatyti HCV genotipus, norint pasirinkti tikslų gydymo režimą [48].

Šiuolaikinis globalus HCV genotipų geografinis pasiskirstymas yra sudėtingas [49] (1 pav.). HCV genotipų heterogeniškumas pagal geografinį pasiskirstymą parodo epidemiologijos, perdavimo būdų ir etninio kintamumo skirtingose šalyse skirtumus [50]. HCV 1 genotipas (GT) yra labiausiai paplitęs pasaulyje, apimantis apie 46 proc. visų HCV atvejų. HCV GT 3 yra antras labiausiai paplitęs genotipas, sudarantis apie 30 proc. atvejų. Genotipai 2, 4 ir 6 apima apie 23 proc. atvejų, o 5 GT nustatomas mažiau nei 1 proc. atvejų [23]. HCV GT 1 labiau paplitęs išsivysčiusiuose regionuose, kaip Europoje (dominuoja GT 1a), Šiaurės Amerikoje (dominuoja 1a ir 1b genotipai). Azijoje labiausiai paplitęs HCV GT 3 (apie 40 proc. visų infekcijų žemyne), o Afrikoje – GT 4 (ypač GT 4a Egipte) [52]. Nustatyta, jog keli HCV subtipai, ypač 1a, 1b, 2a ir 3a, pasaulyje plačiai paplitę bei apima didžiąją dalį visų HCV infekcijų dideles pajamas gaunančiose šalyse. Jie vadinami „epideminiai subtipai“. Daugelis kitų HCV subtipų yra priskiriami „endeminiai“ padermei, kadangi šie subtipai aptinkami palyginus retai ir ilgą laiką cirkuliavo labiau ribotuose regionuose: endeminės genotipų 1 ir 2 padermės daugiausiai Vakarų Afrikoje, GT 3 – Pietų Azijoje, GT 4 – Centrinėje Afrikoje ir Viduriniuose Rytuose, GT 5 – Pietų Afrikoje, GT 6 – Pietryčių Azijoje [49].

Pagal 2016 metais atlikto tyrimo duomenis, Europoje dominuojantis yra HCV GT 1 (64,4 proc.), sudarantis 70 proc. C. Europoje, 68,1 proc. R. Europoje ir 55,1 proc. V. Europoje. Antrąją vietą

užima HCV GT 3 (25,5 proc.), svyruojantis nuo 29 proc. V. Europoje, 26 proc. R. Europoje iki 21 proc. C. Europoje. HCV GT 2 yra trečias pagal dažnumą (5,5 proc.) genotipas Europoje, užimantis 8,9 proc. V. Europoje, 4,3 proc. R. Europoje ir 3,2 proc. C. Europoje. HCV GT 4, tradiciškai aptinkamas Centrinėje Afrikoje ir Viduriniuose Rytuose, Europoje pasiskirstęs: 5,8 proc. V. Europoje, 4,9 proc. C. Europoje, 0,5 proc. R. Europoje. HCV GT 5 ir GT 6 procentaliai užima labai mažą dalį visų genotipų Europoje [19].



**1 pav. Santykinis kiekvieno HCV genotipo paplitimas pagal GBD (angl. Global Burden of Disease) regionus [49].**

Lietuvoje dažniausiai aptinkamas GT 1 (apie 60 proc.), kiek rečiau aptinkami GT 3 ir GT 2 (apie 40 proc.). HCV paplitimas Lietuvoje siekia 1-2,9 proc. Pagal 2003-2009 metais atliktų tyrimų duomenis, Lietuvoje HCV GT 1a užima 2 proc., GT 1b – 69 proc., kiti GT 1 – 4 proc., GT 2 – 6 proc., GT 3 – 19 proc. [49].

HCV genotipo paplitimas skiriasi priklausomai nuo perdavimo kelio ir infekuotų individų amžiaus, kaip, pavyzdžiui, HCV genotipai 3a ir 1a yra stipriai išreikšti tarp intraveninių narkotikų vartotojų ir HCV GT 1b yra dažnai aptinkamas pacientams, turėjusiems kraujo perpylimus [24]. Dešimto dešimtmečio pradžioje paplitę GT 1b ir GT 2, daugiausiai susiję su nosokominiu perdavimo būdu, dalinai buvo pakeisti GT 1a, GT 3 ir GT 4, kurių pagrindiniai HCV perdavimo rizikos faktoriai yra intraveninių narkotikų vartojimas ir aukštos rizikos seksualinės praktikos [19].

Individai gali būti infekuoti ir turėti daugiau nei vieną genotipą, kitaip žinomą mišrią infekciją, kuri pasireiškia iki 25 proc. šių asmenų, turinčių didžiausią užsikrėtimo riziką [53].

Niu ir kt. 2016 metais atliktame tyrime nustatyta, jog tam tikrų genotipų dažnis aukštesnis labiau tarp vyrų nei moterų. Italų mokslininkų tyrimo duomenimis, lyčių pasiskirstymas pagal genotipus: HCV GT 1b moterys užima 54 proc., vyrai – 41,5 proc., o HCV GT 3a moterys užima 10,2 proc., o

vyrų – 0 proc. [54]. Kita vertus, Rouabhia su kolegomis savo tyrime [7] pabrėžė, kad nėra ryšio tarp HCV genotipų ir lyties, skirtingi HCV genotipai pasiskirstę tuo pačiu vyrų ir moterų santykiu.

Atliktuose moksliniuose tyimuose nustatyta, jog HCV subtipai 1a ir 1b yra dažnesni tarp vyresnių pacientų (51-60 metų amžiaus), kai tuo tarpu 3a yra dažniausias jaunesnių pacientų (10-20 metų amžiaus) subtipas [55].

Tam tikri HCV genotipai susiję su didesne hepatoceliulinės karcinomos išsivystymo rizika. Kaip pavyzdžiui, lyginant su GT 1, GT 3 susijęs su 80 proc. didesne hepatoceliulinės karcinomos rizika [51].

## **1.7. Hepatito C laboratorinė diagnostika**

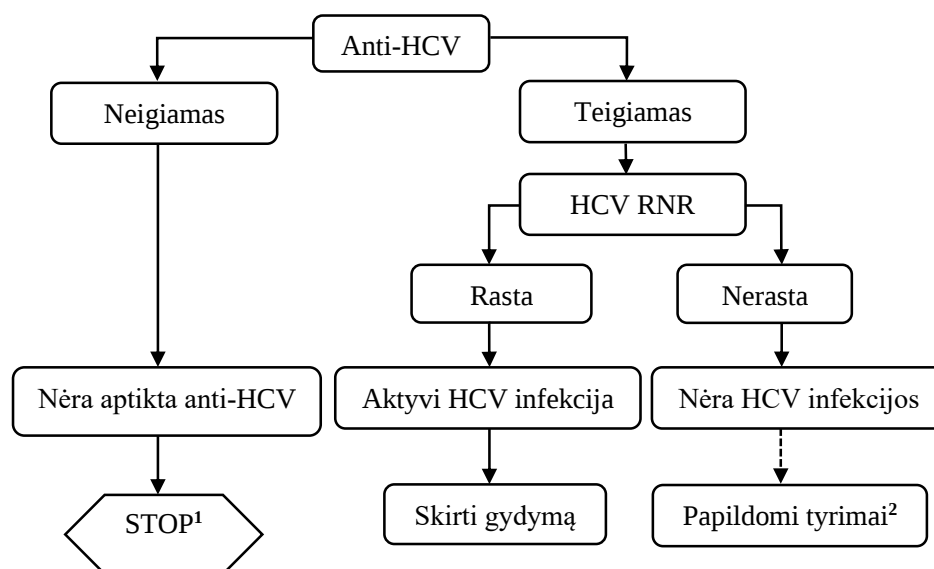
Virusinės infekcijos diagnozavimo tikslas yra identifikuoti užsikrėtusius asmenis ir suteikti gydymą. Virusinės infekcijos diagnostika yra svarbi, sustabdamas ligos progresavimą ir virusų plitimą. Dauguma ūminių hepatito C infekuotų pacientų nepatiria simptomų, dėl to simptomatika negali būti naudojama kaip specifinis hepatito C infekcijos indikatorius [6].

HCV infekcijos virusologinė diagnostika remiasi dvejomis laboratorinių tyrimų kategorijomis: serologiniai tyrimai (netiesioginiai), kurie nustato specifinius HCV antikūnus (anti-HCV), ir tyrimai (tiesioginiai), kurie gali aptikti, kiekybiškai įvertinti ir apibūdinti HCV virusinių dalelių komponentus, tokius kaip HCV RNR ar HCV šerdinį antigeną. Šie tyrimai yra svarbūs nustatant infekcijos diagnozę, priimančią gydymo strategiją ir vertinant virusologinį atsaką į gydymą [56]. Pagal JAV ligų kontrolės ir prevencijos centrų rekomendacijas [57], HCV diagnostika pradedama nuo HCV antikūnų tyrimo. HCV infekcijos diagnostikos algoritmas pateikiamas 2 pav.

Kai diagnozė patvirtinama, toliau HCV ištyrimo algoritme seka HCV genotipo nustatymas prieš pradedant gydymą [58]. Nors HCV RNR aptikimas ir kiekybinis įvertinimas yra standartinis metodas diagnozuojant aktyvią HCV infekciją, HCV genotipavimas yra lemiamas tyrimas nustatant gydymo trukmės režimą [42].

Kol infekuotiems pacientams ūminė HCV infekcija trunka kelis mėnesius, per kuriuos organizme pagaminami antikūnai prieš infekcijos sukėlėją, iš dalies jų spontaniškai pašalinama infekcija ir pacientai tampa anti-HCV teigiamais, tačiau HCV RNR neigiamais. Likusi dalis užkrėstųjų tampa lėtiniais infekcijos nešiotais ir išlieka anti-HCV teigiamais bei HCV RNR teigiamais [39]. Gavus teigiamą antikūnų testą, tačiau neradus RNR kopijų kraujyje, po 3 mėnesių kartojamas HCV RNR tyrimas įsitikinti, kad įvyko savaiminis viruso pašalinimas iš organizmo [49]. Duotajai populiacijai, lėtinę infekciją turinčių pacientų proporcija iš visų infekuotų individų, nusako HCV vireminį dažnį šiai populiacijai [39].

Molekuliniai hepatito C tyrimai gali būti skirstomi į trys pagrindines kategorijas: 1) tyrimai, kurie nustato esantį arba nesantį HCV RNR genomą paciento plazmoje ar serume (pvz.: kokybiniai HCV RNR testai); 2) tyrimai, kurie apskaičiuoja HCV RNR kiekį kraujyje, kitaip žinomą kaip viruso titrą (pvz.: kiekybiniai HCV RNR testai); ir 3) tyrimai, kurie nustato genetinę HCV prigimtį (pvz.: HCV genotipavimas) [40].



<sup>1</sup> Asmenims, kurie galėjo užsikrėsti HCV per paskutinius 6 mėnesius, rekomenduojamas HCV RNR arba pakartotinas anti-HCV tyrimai. Imunodeficitinės būklės pacientams rekomenduojamas HCV RNR tyrimas.

<sup>2</sup> Siekiant atskirti buvusią HCV infekciją nuo klaidingai teigiamo ant-HCV tyrimo rezultato, siūloma tirti naudojant kitą anti-HCV nustatymo testą. Pakartotinis HCV RNR tyrimas rekomenduojamas, kai tikėtina, jog asmuo galėjo užsikrėsti HCV per paskutinius 6 mėnesius arba turi klinikinių ligos požymių, arba jeigu yra abejonių dėl apdoravimo ir tiriamosios

**2 pav. Rekomenduojama tyrimo seka esamai HCV infekcijai nustatyti (pagal 57).**

### 1.7.1. Hepatito C viruso RNR nustatymas

Esamos HCV infekcijos diagnozės patvirtinimas priklauso nuo viremijos nustatymo [59]. HCV RNR aptinkamas serume ar plazmoje jau po 1 savaitės nuo užsikrėtimo bei išlieka patikimiausias žymuo ir „auksinis standartas“ aktyvios HCV infekcijos diagnostikoje [60]. HCV nukleorūgščių tyrimai ypač naudingi nustatant ūminės HCV infekcijos diagnozę, kadangi RNR jau aptinkama po 1 savaitės nuo kontakto adatos dūrio ar kraujo perpylimo metu, bei mažiausiai 4-6 savaitės prieš serokonversiją, kaip įrodyta daugelio perdavimo būdų atvejais [56]. HCV infekcijos serologinis langas gali būti išsprendžiamas naudojant kokybinius ir kiekybinius nukleorūgščių tyrimus, kurie turi plačias aptikimo ribas [61].

Nustatant HCV RNR naudojami kokybiniai ir kiekybiniai PGR tyrimai. PSO nustatė tarptautinį standartą HCV RNR kiekybinio matavimo vienetams, t.y. HCV RNR tarptautinį vienetą (TV), kuris

naudojamas visuose komerciniuose HCV RNR kiekybinio nustatymo tyrimuose, nesvarbu kokie nustatymo metodai naudojami [6]. HCV RNR tyrimai pagrįsti realaus laiko PGR yra naudojami klinikinėse virusologijos laboratorijose RNR aptikimui ir kiekybiniam įvertinimui [62]. HCV RNR aptikimas ir kiekybinis įvertinimas naudojamas klinikinėje praktikoje: 1) diagnozuoti lėtinę HCV infekciją, 2) nustatyti pacientus, kuriems reikalingas antivirusinis gydymas, 3) monitoruoti virusologinius atsakus į antivirusinį gydymą, 4) ateityje, identifikuoti aminorūgščių pokyčius, atsakingus už atsparumą specifiniams HCV baltymų inhibitoriams [62].

Pagal LR Sveikatos ministro įsakymą, HCV RNR tyrimas atliekamas PGR metodu, kurio aptikimo riba yra lygi 20 TV/ml arba mažesnė [33]. Procedūra apima mėginyje esančių nukleorūgščių ekstrakciją ir RNR atvirkštinę transkripciją, sukuriančią viengrandę kopijinę DNR (angl. *cDNA*), kuri toliau yra amplifikuojama naudojant HCV specifinius pradmenis PGR [37].

Komerciniai HCV RNR nustatymo tyrimai leidžia gydytojams, tyrimų laboratorijoms ir kraujo bankams atlikti gerai kontroliuojamus, nuoseklius ir atkuriamus viremijos nustatymo testus ir monitoruoti ligos progresavimą [63]. HCV RNR kiekiui pacientų mėginiuose įvertinti buvo sukurtos dvi skirtingos technologijos: taikinio amplifikacijos metodai, tokie kaip kiekybinė PGR, ir signalo amplifikacijos technologijos, kaip pavyzdžiui, DNR hibridizacijos (angl. *bDNA*) tyrimas [40]. Nors DNR hibridizacijos tyrimas techniškai yra paprastesnis ir mažiau tikėtina kryžminė kontaminacija, HCV infekcijos patvirtinimui patartina atlikti PGR tyrimus dėl jų aukšto jautrumo [59]. Realus laiko PGR yra jautresnė (apatinė aptikimo riba 10-15 TV/ml) nei klasikinė PGR, dėl to buvo pasirinktas kaip pagrindinis HCV RNR aptikimo ir nustatymo metodas klinikinėje praktikoje [65].

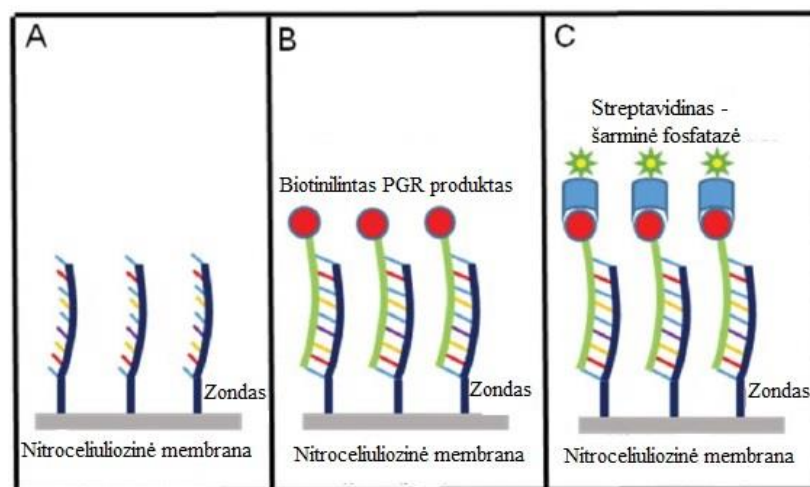
HCV RNR aptikimas yra „auksinis standartas“ diagnozuojant HCV infekciją, tačiau vis dar išlieka daug faktorių, tokių kaip lengvai sunaikinama RNR, menkas stabilumas, aukšti tyrimo sąlygų bei mėginių surinkimo ir išsaugojimo reikalavimai, klaidingai teigiami rodikliai dėl kryžminės kontaminacijos, lemiančių realaus laiko PGR rezultatus [66].

### **1.7.2. Hepatito C viruso genotipo nustatymas**

Rutininėje klinikinėje praktikoje, HCV genotipas yra nustatomas naudojant komerciškai prieinamus genotipavimo tyrimus [67]. Komerciniai HCV genotipavimo tyrimai yra paremti skirtingomis strategijomis (DNR sekvenavimas, atvirkštinė hibridizacija, realaus laiko PGR) ir jiems naudojami atskiri HCV genomo taikiniai [68]. Kadangi ūmi HCV infekcija paprastai yra besimptomė, genotipavimas dažniausiai atliekamas pacientams, turintiems lėtinę infekciją [69].

„Auksinis standartas“ HCV genotipavimui yra nukleotidų sekvenavimas, kuris gali būti atliekamas naudojant šerdies (C), apvalkalo (E1) ar nestruktūrinius (NS5B) regionus, amplifikuojamus

atliekant atvirkštinę transkripciją toliau sekant polimerazės grandininei reakcijai [70]. Minėtam tyrimui naudojami genotipui ir subtipui specifiniai pradmenys, HCV genomo 5' netransliuojamo, šerdies ir NS5B regionų amplifikacijai, ir fluorescenciniais dažais pažymėti oligonukleotidų zondai, HCV genotipų ir subtipų diferenciacijai [71]. Atliktame tyrime buvo naudojamas *Versant HCV genotype 2.0* (Siemens) testas, kurio taikiniai yra HCV 5' netransliuojamas ir šerdies regionai. Šis kolorimetrinis tyrimas (žr. 3 pav.) yra pagrįstas standartine PGR amplifikacija, po kurios atliekama atvirkštinė hibridizacija ant membraninių juostelių, turinčių specifinius zondus, ir gautas juostelių raštas vizualiai interpretuojamas [72].



A – *Versant* zondo tyrimą sudaro oligonukleotidų zondai imobilizuoti ant nitroceliuliozinės membranos, B – zondai fiksuoja genotipui specifinius biotinilintus ampikonus, C – streptavidinas su šarmine fosfataze nukreipiami prisijungti biotiną, vėliau pridedamas chromogeninis substratas, leidžiantis vizualizuoti tyrimą.

**3 pav. *Versant HCV genotype 2.0* tyrimo principas** (pagal 63).

Kai genotipas nustatomas, tyrimo kartoti nebereikia [73]. HCV genotipas dažniausiai išlieka nepakitęs visam gyvenimui.

HCV 5' netransliuojamas regionas, šerdis ir polimerazės (NS5B) regionai yra dažniausi genotipavimo tyrimų taikiniai [74]. Genotipavimui naudojamais metodais, kurių taikiniai tik sekos, esančios 5' netransliuojamame regione, negalima tiksliai nustatyti GT 1a ir 1b, arba diferencijuoti tarp GT 1 ir GT 6. Naujesni metodai apima papildomus taikinius, tokius kaip sekos NS5B ar šerdies regionuose, genotipavimo tikslumui pagerinti [63].

Genotipai yra labai naudingi nustatant gydymo režimo trukmę ir numatant atsaką į gydymą [70]. HCV genotipo nustatymas yra privalomas dvigubam antivirusiniam gydymui (interferonas ir ribavirinas), kadangi pacientai, turintys 1 ar 4 genotipą, gydomi ilgesnį laiką nei pacientai, turintys 2 ar 3 genotipus [61]. Visame pasaulyje gydymo strategijos yra paremtos HCV genotipais, prieš taikant gydymą yra būtina nustatyti tam tikrą genotipą, norint nuspręsti antivirusinės gydymo tipą ir trukmę, tiesiogiai arba netiesiogiai veikiančiais antivirusiniais vaistais [75].

## 2. TYRIMO METODIKA

### 2.1. Tyrimo eiga ir tiriamųjų atranka

Buvo atlikta retrospektyvinė pacientų, tirtų dėl HCV infekcijos Lietuvos sveikatos mokslų universiteto (LSMU) Laboratorinės medicinos klinikoje laikotarpiu nuo 2018-01-01 iki 2018-12-31, duomenų analizė. Įtraukimo į tiriamųjų populiaciją kriterijai pacientams: tiriamųjų amžius  $\geq 18$  m., vyrai ir moterys, nustatyta esanti pirminė HCV viremija ir genotipas. Į tyrimą neįtraukti jaunesni nei 18 m. pacientai ir kuriems tiriamuoju periodu nebuvo nustatyti abu, HCV viremija bei genotipas.

Iš 380 pacientų buvo atrinkti 200 pacientų, kuriems buvo nustatyta HCV pirminė viremija ir genotipas. Įvertinti tiriamųjų lytis ir amžius.

### 2.2. Viremijos nustatymas *in vitro* nukleorūgščių amplifikacijos tyrimu

#### 2.2.1. Ėminiai ir tiriamųjų mėginių paruošimas

Veninis kraujas buvo surenkamas į standartinius vakuuminius mėgintuvėlius su EDTA. Po paėmimo, mėgintuvėlio turinys buvo sumaišomas apverčiant 8 kartus, nekratant. Mėgintuvėliai buvo nugabenami į laboratoriją per 24 val. nuo surinkimo gabenimui skirtame inde 2-8°C temperatūroje. Mėgintuvėliai buvo centrifuguojami 1000 x g 10-15 min ir pagal standartines laboratorijos procedūras atskiriama plazma nuo ląstelių. Mėginiai buvo ruošiami perkeliant 1200 µl plazmos į 2 ml H arba I tipo mikromėgintuvėlį. Nukleorūgščių amplifikacijai buvo naudojami „QIA-symphony® SP/AS“ (QIAGEN, Vokietija) instrumentai ir „Rotor-Gene® Q MDx 5plex HRM“ (QIAGEN, Vokietija) termocikleris bei „artus HCV QS-RGQ Kit“ reagentų rinkinys. Po RNR išgryninimo, likę nepanaudoti mėginiai buvo užšaldomi ir saugomi -80°C temperatūroje.

#### 2.2.2. Reagentai

Tyrimui naudotas „artus HCV QS-RGQ Kit“ rinkinys. Rinkinyje esantys reagentai:

- Hepatito C viruso A pagrindinis mišinys (3×820 µl)
- Hepatito C viruso B pagrindinis mišinys (3×200 µl)
- Hepatito C viruso RG QS 1 ( $10^4$  IU/µl) (200 µl)
- Hepatito C viruso RG QS 2 ( $10^3$  IU/µl) (200 µl)
- Hepatito C viruso RG QS 3 ( $10^2$  IU/µl) (200 µl)
- Hepatito C viruso RG QS 4 ( $10^1$  IU/µl) (200 µl)
- Hepatito C viruso RG vidinė kontrolinė medžiaga (2×1000 µl)

- Vanduo (PGR klasės) (1900 µl)

QS (angl. *quantification standard*) – kiekybinio nustatymo standartas.

„artus HCV QS-RGQ Kit“ komponentai laikomi nuo -15° iki -30°C temperatūroje. Į „QIAasymphony® SP/AS“ instrumentus įkelti reagentai išlieka stabilūs mėginio ruošimo metu, kol yra tiriamas vienos procedūros didžiausias galimas mėginių skaičius (3 laikiklių procedūra).

### 2.2.3. Tyrimo principas

„QIAasymphony® SP“ instrumente vyksta pilnai automatizuotas HCV nukleorūgščių gryninimas, naudojant magnetinių dalelių technologiją. Mėginiai su išgrynintomis nukleorūgštimis perkeliama į „QIAasymphony® AS“ instrumentą, kur atliekamas tyrimo parengimas: pagrindinio mišinio paruošimas, paskirstymas ir tiriamų mėginių perkėlimas. Po šio etapo mėginiai perkeliama į „Rotor-Gene® Q MDx 5plex HRM“ termociklerį, kur atliekama realaus laiko polimerazės grandininė reakcija. Ši reakcija yra paremta specifinių HCV genomo regionų amplifikacija. Amplifikacijos produktas aptinkamas naudojant fluorescuojančius dažus. Šie dažai yra susieti su oligonukleotido zondais, kurie jungiasi specifiskai prie amplifikuoto produkto. Fluorescencijos intensyvumo stebėjimas, realiu laiku vykdant PGR, leidžia aptikti ir kiekybiškai įvertinti padaugintą produktą.

### 2.2.4. Darbo eiga

Prieš pradedant tyrimą buvo paruošiamas mišinys su nešančiąja RNR (CARRIER), buferiniu tirpalu AVE (AVE) ir HCV RG vidine kontroline medžiaga, kurio tūris mėginiui buvo 120 µl.

### **Viruso RNR gryninimo procedūra naudojant „QIAasymphony® SP“ ir procedūra „QIAasymphony® AS“ instrumente**

Paruošus instrumentus, įjungiamas „QIAasymphony® SP“, prisiregistruojama prietaise. Pagal naudotojo vadovą paruošiami atliekų, eliuato, reagentų bei vartojimo reikmenų, mėginių stalčiai. Atliekamas reikmenų nuskaitymas. Į „QIAasymphony®“ įvedama informacija apie kiekvieną tiriamų mėginių partiją (eliuavimo tūris: numatytas – 60 µl, pradinis – 90 µl; mėginio tūris (įskaitant perteklinį tūrį): 1200 µl plazmos). Suvesta informacija patvirtinama ir įjungiamas procedūros vykdymas.

Į „QIAasymphony AS®“ instrumento stalčius įkeliami reikalingi komponentai, tyrimų stoveliai, patikrinama temperatūra aušinimo vietose. Kiekvienas mėgintuvėlis pripildomas atitinkamu reagento tūriu. Į mėgintuvėlį perkeliama 25 µl pagrindinio mišinio. Nuskaitymas tyrimo rinkinys. Įkeliamas reagentų laikiklis bei mėgintuvėliai į atitinkamas aušinamo adapterio vietas, vienkartiniai filtrų antgaliai į eliuato, reagentų ir tyrimų stalčius. Uždaromi stalčiai, nuskaitymi jų reikmenys. Tyrimo parengimas pradedamas automatiškai, kai pasibaigia gryninimo procedūra „QIAasymphony® SP“ ir eliuato stoveliai

perkeliami į „QIASymphony® AS“. Baigus procedūrą, iš tyrimų stalčiaus išimami tyrimo stoveliai ir likę reagentai, kurie pašalinami laikantis laboratorijos reikalavimų. Atsiunčiami rezultatų ir ciklerio failai. Procedūros ciklerio failas perkeliamas į „Rotor-Gene® Q“ termociklerį.

### Procedūra naudojant „Rotor-Gene® Q“ termociklerį

Pasirenkamas 72 šulinėlių rotorius, patvirtinami procedūros parametrai (žr. 1 lentelė). Įvedamas naudotojo ID ir reakcijos tūris (50 µl). Mėginių ID sąrašas perkeliamas iš „QIASymphony® SP/AS“ į „Rotor-Gene® Q“. Perkeliamas atitinkamas ciklerio failas į kompiuterį ir atidaromas. Suteikus pavadinimus mėginiams, spaudžiamas „Finish“ mygtukas. PGR mėgintuvėliai uždaromi ir įdedami į „Rotor-Gene® Q“ 72 šulinėlių rotorių. Sukuriamas temperatūros profilis pagal 1 lentelę. Įsitikinama, jog gavimo optimizavimo nustatymai yra: 72°C temperatūra, žalio ir oranžinio kanalo mėgintuvėlio vieta QS1, min. rodmuo 5 FI, maks. rodmuo 10 FI, min. gavimas -10, maks. gavimas 10. Pradedama PGR procedūra.

**1 lentelė. „Rotor-Gene® Q“ instrumento procedūros parametrai.**

| PGR etapas                                   | Temperatūra, °C | Trukmė  | Gavimo kanalai                                            | Ciklų skaičius |
|----------------------------------------------|-----------------|---------|-----------------------------------------------------------|----------------|
| Atvirkštinės transkripcijos                  | 50              | 10 min. | Nėra                                                      | 1              |
| Pradinė denatūracija/<br>fermentų aktyvacija | 95              | 2 min.  | Nėra                                                      | 1              |
| Denatūracija                                 | 95              | 10 s    | Nėra                                                      | 45             |
| Prisijungimas                                | 55              | 20 s    | Nėra                                                      | 45             |
| Elongacija                                   | 72              | 20 s    | Taikiny: žalia<br>Vidinė kontrolinė<br>medžiaga: oranžinė | 45             |

### 2.2.5. Rezultatų vertinimas

PGR procedūrų rezultatų interpretavimas atliekamas naudojant „Rotor-Gene® Q“ termociklerio programinę įrangą.

#### Kiekybinis nustatymas

Standartinei kreivei „Rotor-Gene® Q“ termocikleryje sukurti naudojami keturi kiekybinio nustatymo standartai (QS 1-4), kurie atitinka tam tikras koncentracijas.

Tyrimo gautos reikšmės pateikiamos TV/µl vienetais. Pagal PSO tarptautinį standartą, koncentracija mėginyje TV/ml nurodoma naudojant šią lygtį:

$$\text{Rezultatas (TV/ml)} = \frac{\text{Rezultatas eliuate } \left(\frac{\text{TV}}{\mu\text{l}}\right) \times \text{Pradinis eliuavimo tūris (90 } \mu\text{l)}}{\text{Mėginio tūris (1 ml)}}$$

Tyrimo rezultatai, gauti atlikus procedūrą „Rotor-Gene® Q“ termocikleryje, vertinami pagal žemiau pateiktą 2 lentelę.

**2 lentelė. Tyrimo rezultatų, gautų naudojant „artus HCV QS-RGQ Kit“, vertinimas.**

| Signalas aptiktas žaliame kanale | Signalas aptiktas oranžiniame kanale | Kiekybinis rezultatas (TV/ml)    | Interpretacija                                                                                                                             |
|----------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Taip                             | $\geq 25,00$                         | $< 15$                           | HCV RNR aptikta $< 15$ TV/ml, kiekybinis nustatymas negalimas, nes kiekybinis rezultatas nesiekia tyrimo tiesinio intervalo apatinės ribos |
| Taip                             | $\geq 25,00$                         | $\geq 15$ ir $\leq 2000$         | Aptikta apskaičiuotos koncentracijos HCV RNR. Kiekybinis rezultatas patenka į tyrimo tiesinį intervalą                                     |
| Taip                             | $\geq 25,00$                         | $> 2000$ ir $\leq 1 \times 10^8$ | Aptikta apskaičiuotos koncentracijos HCV RNR. Kiekybinis rezultatas patenka į tyrimo tiesinį intervalą                                     |
| Taip                             | Taip/Ne                              | $> 1 \times 10^8$                | HCV RNR aptikta. Kiekybinis nustatymas neįmanomas, nes kiekybinis rezultatas viršija viršutinę tyrimo tiesinio intervalo ribą              |
| Ne                               | $\geq 25,00$                         | 0                                | Tinkamas rezultatas: neaptikta HCV                                                                                                         |
| Ne                               | Ne                                   | -                                | Netinkamas rezultatas: nepavyko gauti rezultatų                                                                                            |

## 2.3. HCV amplifikacija genotipui nustatyti

### 2.3.1. Tiriamųjų mėginių ruošimas

Mėginiai buvo ruošiami pagal procedūrą, aprašytą 2.2.1. skyrelyje. Užšaldyti mėginiai buvo atšildomi kambario temperatūroje ( $15-25^{\circ}\text{C}$ ) prieš pat amplifikaciją. Tyrime buvo naudojami „VERSANT® HCV Amplification 2.0 Kit (LiPA)“ (Siemens Healthineers, Vokietija) rinkiniai ir „GeneAmp® PCR System 9700“ (Applied Biosystems, JAV) termocikleris. Amplifikacijai buvo imama 20  $\mu\text{l}$  išgrynintos RNR.

### 2.3.2. Reagentai

Tyrimui naudoto „VERSANT® HCV Amplification 2.0 Kit (LiPA)“ rinkinio reagentai (laikomi nuo  $-15^{\circ}$  iki  $-25^{\circ}\text{C}$  temperatūroje):

- ENZ MIX (4 $\times$ 45  $\mu\text{l}$ ) – sudarytas iš Sensiscript® ir Omniscript® atvirkštinių transkriptazių, HotStarTaq® polimerazės ir uracil-N-glikozilazės

- AMP MIX (1×1,4 ml) – sudarytas iš sintetinių oligonukleotidų buferyje kartu su dNTP/dUTP mišiniu ir MgCl<sub>2</sub>

### 2.3.3. Tyrimo principas

HCV amplifikacija atliekama su išgryninta RNR iš kraujo plazmos. Pirmiausia vykdoma atvirkštinė transkripcija, po jos seka polimerazės grandininė reakcija. Genominė HCV RNR yra atvirkščiai nutranskribuojama į komplementarią DNR (kDNR), naudojant HCV specifinius pradmenis. Mišinys yra pašildomas PGR amplifikacijos procedūrai, kad aktyvuoti DNR polimerazę ir kartu inaktyvuoti atvirkštinę transkriptazę. Nuo kDNR atliekama HCV genomo 5' netransliuojamo ir šerdinio regionų dalių amplifikacija, naudojant dvi poras biotinilintų pradmenų. Pagaminami du atskiri 240 ir 270 bazių porų DNR fragmentai, kurie atitinkamai reprezentuoja 5' netransliuojamą ir šerdinį HCV regionus.

### 2.3.4. Darbo eiga

Pirmiausia, pagal naudotojo vadovą buvo paruošiamas „GeneAmp® PCR System 9700“ termocikleris ir reagentai. Ruošiant AT-PGR (atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininės reakcijos) pagrindinį mišinį, visi reagentai ir priemonės buvo laikomi ant ledo. Į sterilų mėgintuvėlį buvo pridėdama N×26 µl AMP MIX į N×4 µl ENZ MIX (kur N=(RNR mėginių skaičius, įskaitant 1 teigiamą ir 1 neigiamą kontrolę)+1). Mišinys buvo trumpai supipetuojamas, vorteksuojamas ir tada trumpai nucentrifuguojamas. Į kiekvieną reakcijos mėgintuvėlį buvo pridėdama 30 µl AT-PGR pagrindinio mišinio ir 20 µl išgrynintos RNR. Mėgintuvėliai buvo laikomi 10±1 min. nuo 18° iki 25°C temperatūroje prieš amplifikaciją, kad neliktų užteršiančių, uracilą turinčių DNR. Mėgintuvėliai buvo patalpinami į termociklerį ir atliekama PGR procedūra. PGR procedūros etapai, jiems atlikti reikalinga temperatūra ir trukmė nurodyta 3 lentelėje.

**3 lentelė. PGR procedūros etapai ir nustatymai termocikleryje.**

| Etapas                               | Temperatūra | Trukmė                       |
|--------------------------------------|-------------|------------------------------|
| 1. Atvirkštinės transkriptazės       | 50° ± 0,5°C | 30 min.                      |
| 2. Pradinės PGR aktyvacijos          | 95° ± 0,5°C | 15 min.                      |
| 3. Denatūracija                      | 95° ± 0,5°C | 30 s                         |
| 4. Hibridizacija                     | 50° ± 0,5°C | 30 s                         |
| 5. Pagausinimas                      | 72° ± 0,5°C | 15 s                         |
| 6. 39 kartus kartojami 3-5 etapai    |             |                              |
| 7. Galutinis pagausinimas/elongacija | 72° ± 0,5°C | 2 min.                       |
| 8. Sulaikymo                         | 4° ± 0,5°C  | skirta naudojimui iki 2 val. |

Iš termociklerio išimti mėgintuvėliai su amplikonu buvo naudojami tolesniam „VERSANT<sup>®</sup> HCV Genotype 2.0 Assay (LiPA)“ tyrimui, skirtam nustatyti HCV genotipą. Po tyrimo denatūracijos etapo, likęs PGR produktas patalpinamas ir saugomas  $-20^{\circ}\pm 5^{\circ}\text{C}$  temperatūroje, arba iš karto naudojamas HCV genotipo nustatymo tyrime.

## **2.4. HCV genotipo nustatymas atvirkštinės hibridizacijos principu**

### **2.4.1. Tiriamųjų mėginių ruošimas**

Tyrimui buvo naudojamas iš kraujo plazmos išskirtos viruso RNR PGR produktas, kuris gautas atlikus procedūrą, aprašytą 2.3. skyrelyje. PGR produkto mėginiui į sterilų mėgintuvėlį paimta 10 µl.

### **2.4.2. Reagentai**

Genotipo nustatymo tyrimui buvo naudotas „VERSANT<sup>®</sup> HCV Genotype 2.0 Assay (LiPA)“ rinkinys. Jį sudarantys reagentai:

- CONJ 100X – koncentruotas konjugatas (1×1,5 ml)
- CONJ DIL – konjugato diluentas (1×150 ml)
- DENAT SOLN – denatūracijos tirpalas (1×1 ml)
- HYB SW SOLN – hibridizacijos ir plovimo tirpalas (2 × 220 ml)
- RINSE SOLN 5X – koncentruotas plovimo tirpalas (1 × 150 ml)
- SUBS BUF – substrato buferis (2 × 150 ml)
- SUBS BCIP/NBT 100X – substratas (1 × 1,5 ml)

Reagentai laikomi nuo 2° iki 8°C temperatūroje ir itin saugomi nuo užteršimo.

### **2.4.3. Tyrimo principas**

„VERSANT<sup>®</sup> HCV Genotype 2.0 Assay (LiPA)“ tyrimas paremtas atvirkštinės hibridizacijos principu. Biotinilintos DNR PGR produktas, gautas atlikus HCV RNR 5' netransliuojamo ir šerdinio regionų AT-PGR amplifikaciją, hibridizuojamas imobilizuotais oligonukleotidų zondais. Zondai, kurie yra prisitvirtinę prie nitroceliuliozinės juostelės poli(dT) uodegėle, yra specifiniai skirtingų HCV genotipų 5' netransliuojamui ir šerdiniui regionams. Po hibridizacijos, nehibridizuotas PGR produktas yra nuplaunamas nuo juostelės ir šarmine fosfataze žymėtas streptavidinas (konjugatas) susiriša su biotinilintu hibridu (žr. 3 pav.). SUBS BCIP/NBT reaguoja su streptavidino-šarminės fosfatazės

kompleksu, suformuodamas violetinį/rudą precipitatą, kuris matomas ant nitroceliuliozinės juostelės kaip tam tikras brūkšnelių raštas, interpretuojant nustatomas kaip HCV genotipas.

#### **2.4.4. Darbo eiga**

HCV genotipo nustatymo tyrimas su „VERSANT® HCV Genotype 2.0 Assay (LiPA)“ rinkiniu susideda iš mėginių denatūracijos, hibridizacijos, juostelių plovimo ir spalvos išryškinimo procedūrų.

##### **Mėginių denatūracijos procedūra**

Prieš naudojimą HYB/SW SOLN patalpinamas į 37°–50°C vandens vonelę. Su pincetu paimama po vieną juostelę mėginiui ir padedama ant švaraus paviršiaus, užrašomas identifikacijos numeris. Kiekvienam mėginiui įdedama po vieną lovelį į padėklą. Pridedama 10 µl DENAT SOLN į kiekvieno lovelio viršutinį kampą. Į kiekvieną lovelį pridedama 10 µl mėginio ar kontrolės, atsargiai supipetuojama. 5 min. leidžiama vykti denatūracijai 20°–25°C temperatūroje.

##### **Mėginių hibridizacijos procedūra**

Atsargiai pridedama po 2 ml HYB/SW SOLN į kiekvieną lovelį, švelniai pajudinami, kad susimaišytų reagentai. Nedelsiant kiekviena pažymėta juostelė įdedama į atitinkamą lovelį ir pilnai panardinama tirpale. Padėklas su loveliais dedamas ant maišymo platformos 50°±0,5°C vandens vonelėje. Inkubuojama 60±2 min. 80 rpm maišymo režimu. Kai hibridizacijos inkubacija baigiama, padėklas išimamas iš vandens vonelės.

##### **Juostelių plovimo procedūra**

Su pipete išsiurbiamas tirpalas iš lovelių. Pridedama po 2 ml HYB/SW SOLN į lovelius. Juostelė nuplaunama judinant dėklą 30-90 sekundžių. Iš lovelių išsiurbiamas tirpalas. Pakartojamas juostelių plovimas. Pridedama po 2 ml HYB/SW SOLN į lovelius ir padėklas patalpinamas į 50°±0,5°C vandens vonelę, kurioje inkubuojamas 30±2 min. 80 rpm maišymo režimu. Paruošiama 8 ml praskiesto plovimo tirpalo kiekvienam tyrimo loveliui, skiedžiant RINSE SOLN 5X su distiliuotu vandeniu 1:5, papildomai paruošiama 10 ml tirpalo. Paruošiama 2 ml praskiesto konjugato kiekvienam tyrimo loveliui, skiedžiant CONJ 100X su CONJ DIL 1:100, papildomai paruošiama 2 ml tirpalo. Kai inkubacija baigiama, padėklas išimamas iš vandens vonelės.

##### **Spalvos išryškinimo procedūra**

1) Pipete išsiurbiamas tirpalas iš lovelių. 2) Pridedama po 2 ml praskiesto plovimo tirpalo į lovelius ir juostelė nuplaunama judinant padėklą 60-90 sekundžių. 3) Išsiurbiamas tirpalas iš lovelių.

4) Kartojami 2-3 punktai. 5) Pridedama po 2 ml praskiesto konjugato į lovelius, padėklas patalpinamas ant purtyklės ir inkubuojama  $30 \pm 2$  min. 6) Paruošiama 2 ml praskiesto substrato kiekvienam loveliui ir 2 ml papildomai, skiedžiant SUBS BCIP/NBT 100X su SUBS BUF 1:100. 7) Kai inkubacija baigiama, padėklas išimamas iš purtyklės ir nusiurbiamas tirpalas iš lovelių. 8) Pridedama po 2 ml praskiesto plovimo tirpalo į lovelius ir juostelė nuplaunama judinant padėklą 60-90 sekundžių. 9) Išsiurbiamas tirpalas iš lovelių. 10) Kartojami 8-9 punktai. 11) Pridedama po 2 ml SUBS BUF į lovelius ir juostelė nuplaunama judinant padėklą 60-90 sekundžių. 12) Išsiurbiamas tirpalas iš lovelių. 13) Pridedama po 2 ml praskiesto substrato į lovelius ir padėklas patalpinamas į purtyklę ir inkubuojama  $30 \pm 2$  min. 14) Padėklas išimamas iš purtyklės. 15) Išsiurbiamas tirpalas iš lovelių. 16) Pridedama po 2 ml distiliuoto vandens į lovelius. 17) Padėklas patalpinamas į purtyklę 3-4 min. 18) Padėklas išimamas iš purtyklės. 19) Nusiurbiamas vanduo. 20) Pakartojami 16-19 punktai. 21) Naudojant pincetą, iš kiekvieno lovelio išimama juostelė ir padedama ant sugeriančio popieriaus. 22) Prieš vertinant rezultatus, juostelės pilnai išdžiovinamos, saugomos nuo šviesos.

#### 2.4.5. Rezultatų vertinimas

HCV genotipai nustatomi sulyginant tyrimo juosteles su „VERSANT® HCV Genotype 2.0 Assay (LiPA)“ kortele ir palyginant tyrimo juostelių raštus su raštais, parodytais „VERSANT® HCV Genotype 2.0 Assay (LiPA)“ rezultatų interpretavimo schemeje. Interpretavimo schema yra sudaryta iš A ir B dalių. Pagal A dalį interpretuojamas HCV GT 1, 1a ir 1b subtipai, bei tie HCV 6 genotipai, kurie identifikuojami pagal 5' netransliuojamą ir šerdinį regionus. Pagal B dalį interpretuojami HCV GT 2-5 ir tie HCV 6 genotipai, kurie atskiriami nuo 1 genotipo naudojant tik 5' netransliuojamą regioną. Jei gautasis raštas neatitinka jokio rašto, parodyto 5' netransliuojamo regiono dalyse interpretavimo schemeje, rezultatai negali būti vertinami.

### 2.5. Statistinė duomenų analizė

Tyrimo gauti duomenys buvo analizuojami naudojant statistinės analizės programą *IBM SPSS Statistics v. 26 (IBM Corporation, JAV)*. Kiekybiniams atskirų grupių tyrimų rezultatams įvertinti apskaičiuotas vidurkis ir standartinis nuokrypis (angl. *standard deviation* – *SD*). Kokybinių požymių tarpusavio ryšiui ir pasiskirstymo tarp grupių skirtumui įvertinti taikytas neparametrinis Chi kvadrato ( $\chi^2$ ) kriterijus. Dispersinė analizė (ANOVA) buvo taikoma nustatant viremijos vidurkių pasiskirstymą tarp amžiaus, lyties ir genotipų, bei amžiaus vidurkių pasiskirstymą tarp viremijos grupių ir genotipų. Statistiškai reikšmingais skirtumais buvo laikomi rezultatai, kai statistinio patikimumo lygmuo  $p < 0,05$ .

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Į tyrimą buvo įtraukti 200 pacientų, kuriems 2018 metais LSMU Laboratorinės medicinos klinikoje buvo atlikti HCV viremijos ir genotipo nustatymo tyrimai, rezultatai. Tiriamųjų populiaciją sudarė nuo 22 iki 86 metų amžiaus (amžiaus vidurkis  $51,4 \pm 13,6$  metai) pacientai, 118 vyrų (59 proc.) ir 82 moterys (41 proc.). Tiriamieji pagal amžių buvo suskirstyti į tris grupes: jaunesni nei 44 metų (31,5 proc.), nuo 44 iki 57 metų (33 proc.) ir vyresni nei 57 metų (35,5 proc.). Pirmą kartą tiriamuoju laikotarpiu nustatyta HCV viremija toliau vadinama pirmine viremija, antrą kartą nustatyta – antrine viremija. Tiriamųjų populiacijos HCV viremija buvo suskirstyta į mažos viremijos ( $<6,0 \times 10^5$  TV/ml) ir didelės viremijos ( $>6,0 \times 10^5$  TV/ml) grupes. Pagal atliktą genotipo nustatymo metodą tiriamojoje populiacijoje buvo nustatyti 8 HCV genotipai/subtipai: 1, 1a, 1a/1b, 1b, 2, 2a/2c, 2b, 3a. Jie tyrimo rezultatuose pateikiami kaip atskiros, detalesnės 1, 2 ir 3 genotipų grupės.

Atliktame tyrime vyrų ir moterų amžiaus vidurkiai skyrėsi statistiškai reikšmingai ( $p=0,005$ ), tiriamieji vyrai buvo jaunesni nei moterys. Vyrų amžiaus vidurkis buvo  $49,1 \pm 11,8$ , moterų amžiaus vidurkis –  $54,8 \pm 15,3$ , o bendras tiriamųjų amžiaus vidurkis buvo  $51,4 \pm 13,6$  metai. Pagal suskirstytas amžiaus grupes, 22 proc. vyrų ir 9,5 proc. moterų nustatyta jaunesnių nei 44 metų amžiaus grupėje, 20,5 proc. vyrų ir 12,5 proc. moterų – 44-57 metų amžiaus grupėje, 16,5 proc. vyrų ir 19 proc. moterų – vyresnių nei 57 metų amžiaus grupėje. Tiriamųjų populiacijoje didžiausią dalį ( $n=44$ ) sudarė jaunesni nei 44 metų vyrai, o mažiausią ( $n=19$ ) – tos pačios amžiaus grupės moterys. Iš šių duomenų galima daryti išvadą, jog tiriamųjų populiacijoje HCV infekciją turėjo jaunesni vyrai ir vyresnės moterys.

#### 3.1. HCV viremija tiriamųjų populiacijoje

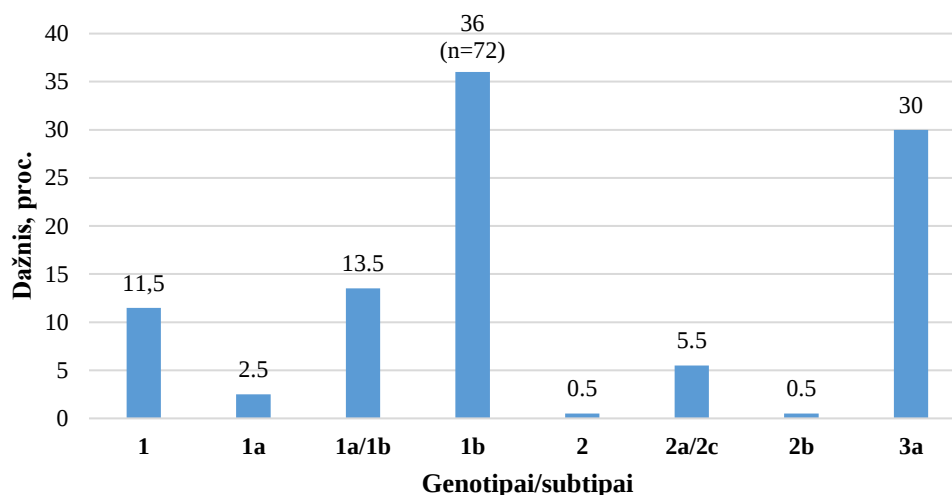
Moksliniuose tyrimuose nustatyta, jog pacientai, turintys didesnę HCV viremiją pasižymi žemesniais atsako į standartinį antivirusinį gydymą rodikliais palyginus su pacientais, turinčiais mažesnę viremiją [76]. Dėl šios priežasties atliktame tyrime buvo svarbu įvertinti HCV viremijos lygį populiacijoje, kaip vieną iš svarbiausių HCV infekcijos rodiklių. Tiriamųjų populiacijoje didžiausia nustatyta HCV pirminė viremija buvo  $6,8 \times 10^7$  TV/ml, mažiausia –  $3,2 \times 10^3$  TV/ml, o visos populiacijos pirminės viremijos vidurkis –  $6,9 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^7$  TV/ml. HCV pirminės viremijos duomenis pagal literatūrą (33,77) suskirsčius į dvi grupes (maža ir didelė viremija), 22,5 proc. ( $n=45$ ) visų atvejų sudarė maža, o 77,5 proc. ( $n=155$ ) – didelė viremija. Pagal Lietuvoje atlikto tyrimo [77] duomenis, tiriamojoje populiacijoje ( $n=164$ ) HCV viremijos grupės pasiskirstė atitinkamai: 31,7 proc. ( $n=52$ ) mažos ir 68,3 proc. ( $n=112$ ) didelės viremijos. Didelė HCV viremija šiame ir atliktame tyrimuose nustatyta apie 2-3

kartus dažniau nei maža viremija. Iš šių rezultatų daryti išvadas, jog Lietuvoje tarp infekuotų HCV dažnesnė didelė viremija, būtų netikslu, reikalingas platesnės populiacijos ištyrimas.

Iš visų tiriamųjų ( $n=200$ ) pakartotinai HCV viremija buvo tirta 66,5 proc. ( $n=133$ ) pacientų. Iš pakartotų tyrimų HCV viremijos buvimas nustatytas 6 pacientams (3 proc. visos populiacijos), likusios dalies tiriamųjų HCV viremija buvo lygi 0 TV/ml. Pakartotinai tirtos HCV viremijos (antrinės viremijos) buvimas nustatytas vienodui skaičiui ( $n=3$ ) moterų ir vyrų, kurių amžiaus vidurkis buvo  $49,8 \pm 17,0$  metai. Dažniausiai šie pacientai turėjo 1a/1b genotipą. 4 iš 6 pacientų nustatyta antrinė viremija priklausė didelės viremijos ( $>6,0 \times 10^5$  TV/ml) grupei. Tyrimo duomenų nepakanka antrinės viremijos lygio populiacijoje, priklausomumo nuo genotipo, lyties bei amžiaus analizei, tam reikia didesnės tiriamųjų imties ištyrimo.

### **3.2. HCV genotipų dažniai tiriamųjų populiacijoje**

Vertinant HCV genotipų pasiskirstymą tiriamųjų populiacijoje, nustatyti šie dažniai: 63,5 proc. ( $n=127$ ) GT 1, 6,5 proc. ( $n=13$ ) GT 2, 30 proc. ( $n=60$ ) GT 3. Pagal gautų genotipo nustatymo rezultatų skirstymą į genotipų/subtipų grupes, tiriamųjų populiacijoje buvo nustatyta 11,5 proc. 1 genotipų, 2,5 proc. 1a subtipų, 13,5 proc. 1a/1b subtipų, 36 proc. 1b subtipų, 0,5 proc. 2 genotipų, 5,5 proc. 2a/2c subtipų, 0,5 proc. 2b subtipų, 30 proc. 3a subtipų. Genotipų/subtipų pasiskirstymas populiacijoje pavaizduotas 4 pav. Išanalizavus rezultatus nustatyta, jog tarp tirtų pacientų labiausiai paplitęs buvo 1b subtipas, po jo sekė 3a subtipas ir 1a/1b subtipas. Remiantis kito [78] Lietuvoje atlikto tyrimo duomenimis pagal dažnį pirmas dvi vietas taip pat užėmė 1b ir 3a subtipai, o trečioje vietoje buvo 2a/2c subtipas. Autoriai teigia, kad šie duomenys atspindi tik tirtos grupės, lėtiniu hepatitu C sergančių pacientų, genotipų paplitimą ir nebūtinai rodo paplitimą visoje Lietuvoje. Pagal ULAC duomenis, Lietuvoje dominuoja 1b genotipas, dažnai aptinkami ir 1a, 2a, 2c bei 3 genotipai, kas patvirtina aprašyto ir atlikto tyrimo genotipų dažnių pasiskirstymo patikimumą tiriamojoje populiacijoje.



**4 pav. Genotipų/subtipų dažnis (proc.) tiriamųjų populiacijoje.**

### **3.3. HCV viremijos ir genotipų tarpusavio priklausomumas tiriamųjų populiacijoje**

Siekiant įvertinti, kaip tiriamųjų populiacijoje HCV pirminės viremijos lygis skiriasi priklausomai nuo genotipų, išanalizuoti kiekvieno nustatyto genotipo pirminės viremijos vidurkiai, didžiausia ir mažiausia reikšmė. Tiriamųjų populiacijoje pirminės viremijos vidurkiai statistiškai reikšmingai nesiskyrė tarp pagrindinių genotipų grupių. GT 1 pacientų pirminės viremijos vidurkis buvo  $6,9 \times 10^6 \pm 1,0 \times 10^7$  TV/ml, didžiausia viremija –  $6,4 \times 10^7$  TV/ml, o mažiausia –  $3,2 \times 10^3$  TV/ml. Pacientų, turinčių GT 2, nustatytas pirminės viremijos vidurkis buvo  $5,8 \times 10^6 \pm 8,3 \times 10^6$  TV/ml, didžiausia viremija –  $3,0 \times 10^7$  TV/ml, o mažiausia –  $2,3 \times 10^5$  TV/ml. Turintiems GT 3 pirminės viremijos vidurkis buvo  $7,1 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^7$  TV/ml, didžiausia viremija –  $6,8 \times 10^7$  TV/ml, o mažiausia –  $1,3 \times 10^4$  TV/ml.

Analizuojant populiacijos HCV genotipų/subtipų grupes nustatyta, jog pirminės viremijos vidurkiai tarp nustatytų genotipų/subtipų grupių populiacijoje statistiškai reikšmingai nesiskyrė ( $p=0,302$ ). Didžiausias pirminės viremijos vidurkis ( $1,3 \times 10^7 \pm 1,5 \times 10^7$  TV/ml) nustatytas pacientams, turintiems 1a subtipą, o mažiausias ( $2,2 \times 10^6$  TV/ml) – su nustatytu 2 genotipu. Didžiausia pirminė viremija ( $6,8 \times 10^7$  TV/ml) nustatyta 3a subtipo pacientų grupėje, o mažiausia ( $3,2 \times 10^3$  TV/ml) – 1b subtipo. Tiriamųjų populiacijos pirminės viremijos vidurkio, mažiausios ir didžiausios reikšmių pasiskirstymas pagal nustatytus genotipus/subtipus pateiktas 4 lentelėje.

**4 lentelė. Pirminės viremijos vidurkis, SD, mažiausios ir didžiausios reikšmės pasiskirstymas pagal genotipą/subtipą**

| <b>Genotipas/<br/>subtipas</b> | <b>Viremijos<br/>vidurkis (TV/ml)</b> | <b>SD (<math>\pm</math>TV/ml)</b> | <b>Mažiausia viremija<br/>(TV/ml)</b> | <b>Didžiausia viremija<br/>(TV/ml)</b> |
|--------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|
| <b>1</b>                       | $8,6 \times 10^6$                     | $1,0 \times 10^7$                 | $1,7 \times 10^5$                     | $4,2 \times 10^7$                      |
| <b>1a</b>                      | <b><math>1,3 \times 10^7</math></b>   | $1,5 \times 10^7$                 | $1,1 \times 10^6$                     | $3,8 \times 10^7$                      |
| <b>1a/1b</b>                   | $1,0 \times 10^7$                     | $1,7 \times 10^7$                 | $4,0 \times 10^4$                     | $6,4 \times 10^7$                      |
| <b>1b</b>                      | $4,6 \times 10^6$                     | $4,9 \times 10^6$                 | <b><math>3,2 \times 10^3</math></b>   | $2,3 \times 10^7$                      |
| <b>2</b>                       | <b><math>2,2 \times 10^6</math></b>   | .                                 | $2,2 \times 10^6$                     | $2,2 \times 10^6$                      |
| <b>2a/2c</b>                   | $6,2 \times 10^6$                     | $9,0 \times 10^6$                 | $2,3 \times 10^5$                     | $3,0 \times 10^7$                      |
| <b>2b</b>                      | $4,0 \times 10^6$                     | .                                 | $4,0 \times 10^6$                     | $4,0 \times 10^6$                      |
| <b>3a</b>                      | $7,1 \times 10^6$                     | $1,3 \times 10^7$                 | $1,3 \times 10^4$                     | <b><math>6,8 \times 10^7</math></b>    |

Pagal mokslininkų Indijoje [79] ir Irake [80] atliktus tyrimus, nebuvo nustatyta statistiškai reikšmingos koreliacijos tarp HCV viremijos ir genotipų/subtipų. Šiems rezultatams galėjo daryti įtaką maža tiriamųjų imtis ir pasirinktas trumpas pacientų ištyrimų laikotarpis. Detalesniam HCV viremijos ir genotipų priklausomybės tyrimui rekomenduojama pasirinkti didesnę tiriamų pacientų imtį ir ilgesnį pacientų tyrimo laikotarpį.

Analizuojant, ar HCV genotipų paplitimas tiriamųjų populiacijoje skiriasi priklausomai nuo mažos ir didelės pirminės viremijos grupių, nustatyta, jog mažos ir didelės viremijos atvejų skaičius statistiškai reikšmingai skyrėsi ( $\chi^2=7,139$ ,  $p=0,028$ ) tarp pagrindinių (1, 2, 3) genotipų. Abiejose viremijos grupėse GT 1 buvo nustatytas dažniau nei 2 ar 3 genotipai. Didelės viremijos grupėje GT 1 buvo nustatytas 2,5 karto dažniau nei GT 3 ir 12 kartų dažniau nei GT 2. Pacientams, turintiems 1 ir 3 genotipus, statistiškai reikšmingai (atitinkamai  $p=0,008$  ir  $p=0,016$ ) daugiau nustatyta didelės viremijos atvejų (atitinkamai  $n=106$  ir  $n=40$ ) nei mažos viremijos (atitinkamai  $n=21$  ir  $n=20$ ). 2012 metais atliktame moksliniame tyrime [81] nustatyta, jog pacientai, infekuoti HCV 1 genotipu, labiau tikėtina turės didesnę viremiją nei infekuoti 2 ar 3 genotipu. Pagal Von ir kt. bei Dalgard ir kt. tyrimų duomenis, HCV 3 genotipu infekuoti pacientai su žema pirmine viremija ( $<600\ 000$ - $800\ 000$  TV/ml) buvo labiau tikėtina pasiekiantys ilgalaikį virusologinį atsaką, palyginus su pacientais su aukšta viremija ( $>600\ 000$ - $800\ 000$  TV/ml) [76]. Todėl tiriant atsaką į antivirusinį gydymą yra labai svarbus viremijos lygio ir HCV genotipo nustatymas, jų tarpusavio priklausomybė.

Genotipus suskirsčius į detalesnes grupes, mažos ir didelės viremijos grupių atvejų skaičius statistiškai reikšmingai nesiskyrė tarp nustatytų subtipų ( $\chi^2=9,869$ ,  $p=0,196$ ). Daugiausiai ( $n=20$ ) mažos viremijos atvejų nustatyta esant 3a subtipui (šie atvejai sudarė 10 proc. visos populiacijos), visiškai nenustatyta atvejų esant 1a, 2, 2b genotipams/subtipams. Vienintelio 3a subtipo pacientų didelės viremijos atvejų buvo statistiškai reikšmingai ( $\chi^2=5,769$ ,  $p=0,016$ ) daugiau nei mažos viremijos (lyginant su kitais nustatytais genotipais/subtipais). Didelės viremijos atvejų daugiausiai ( $n=60$ ) nustatyta esant 1b subtipui (šie atvejai sudarė 30 proc. visos populiacijos), mažiausiai (0,5 proc.,  $n=1$ )

nustatyta esant 2 ir 2b genotipams/subtipams. Išsamus tiriamųjų populiacijos viremijos grupių pasiskirstymas tarp genotipų/subtipų pavaizduotas 5 lentelėje.

**5 lentelė. Mažos ir didelės viremijos grupių pasiskirstymas tarp genotipų/subtipų**

| Pirminė viremija, TV/ml |                     | Genotipas/subtipas |       |       |       |       |       |       |       |
|-------------------------|---------------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                         |                     | 1                  | 1a    | 1a/1b | 1b    | 2     | 2a/2c | 2b    | 3a    |
| <6,0×10 <sup>5</sup>    | Atvejų skaičius (n) | 3                  | 0     | 6     | 12    | 0     | 4     | 0     | 20    |
|                         | proc. populiacijoje | 1,5                | 0,0   | 3,0   | 6,0   | 0,0   | 2,0   | 0,0   | 10,0  |
| >6,0×10 <sup>5</sup>    | Atvejų skaičius (n) | 20                 | 5     | 21    | 60    | 1     | 7     | 1     | 40    |
|                         | proc. populiacijoje | 10,0               | 2,5   | 10,5  | 30,0  | 0,5   | 3,5   | 0,5   | 20,0  |
| <i>p</i>                |                     | 0,248              | 0,222 | 0,970 | 0,138 | 0,589 | 0,257 | 0,589 | 0,016 |

### 3.4. HCV viremija tiriamųjų populiacijoje priklausomai nuo lyties ir amžiaus

Tiriant, ar viremija skiriasi priklausomai nuo lyties, nustatyta, jog pirminės viremijos vidurkiai statistiškai reikšmingai skyrėsi tarp vyrų ir moterų ( $p=0,026$ ). Vyrų grupėje pirminės viremijos vidurkis buvo  $8,3 \times 10^6 \pm 1,2 \times 10^7$  TV/ml, o moterų grupėje nustatytas vidurkis buvo  $4,8 \times 10^6 \pm 8,0 \times 10^6$  TV/ml. Tiriamųjų populiacijos didžiausia ( $6,8 \times 10^7$  TV/ml) ir mažiausia ( $3,2 \times 10^3$  TV/ml) pirminė viremija buvo nustatyta vyrams. Moterų grupėje didžiausia viremija buvo  $4,5 \times 10^7$  TV/ml, o mažiausia –  $1,3 \times 10^4$  TV/ml.

Priešingai nei aprašomame, Irane atliktame tyrime [82], HCV viremijos vidurkiai statistiškai reikšmingai nesiskyrė priklausomai nuo lyties. Vyrų viremijos vidurkis buvo  $3,4 \times 10^6 \pm 2,3 \times 10^6$  TV/ml, o moterų –  $9,9 \times 10^5 \pm 5,1 \times 10^5$  TV/ml. Lyginant su aprašomo tyrimo populiacijos viremijos vidurkiais, abiejuose tyrimuose didesnė viremija nustatyta vyrams nei moterims. Nors dalis mokslininkų teigia, jog vyriška lytis susijusi su didesne viremija, nėra surinkta pakankamai įrodymų, patvirtinančių šią sąsają.

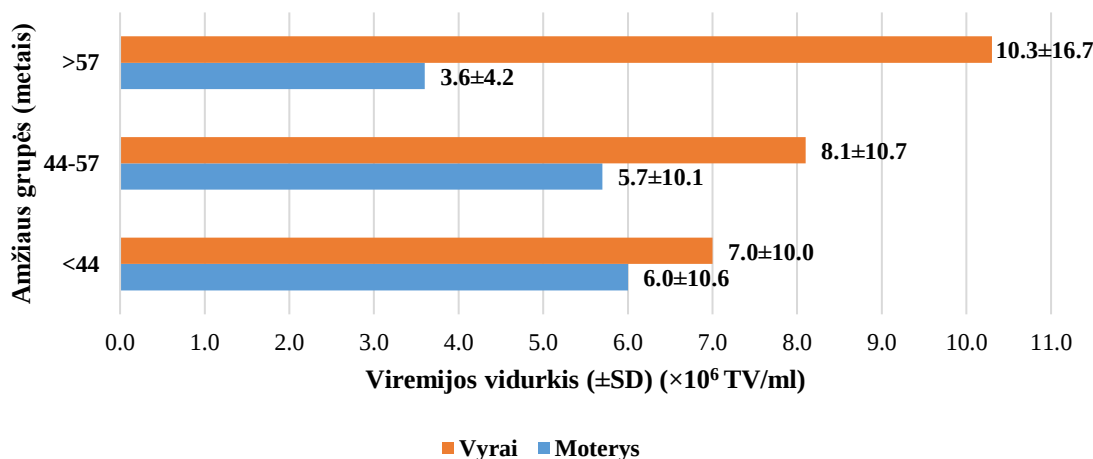
Pirminė viremija kito nepriklausomai nuo tiriamųjų amžiaus. Vyriausio paciento viremija buvo  $4,0 \times 10^4$  TV/ml, jauniausio paciento –  $3,1 \times 10^7$  TV/ml. Didžiausia viremija ( $6,8 \times 10^7$  TV/ml) nustatyta 64 metų pacientui, o mažiausia ( $3,2 \times 10^3$  TV/ml) – 39 metų pacientui.

Pirminės viremijos vidurkiai statistiškai reikšmingai nesiskyrė tarp nustatytų amžiaus grupių tiriamųjų populiacijoje ( $p=0,962$ ). Jaunesnių nei 44 metų amžiaus grupėje pirminės viremijos vidurkis buvo  $6,7 \times 10^6 \pm 1,0 \times 10^7$  TV/ml, 44-57 metų amžiaus –  $7,2 \times 10^6 \pm 1,0 \times 10^7$  TV/ml, o vyresnių nei 57 metų amžiaus grupėje –  $6,7 \times 10^6 \pm 1,2 \times 10^7$  TV/ml. Jauniausių (<44 m.) pacientų grupėje didžiausia nustatyta pirminė viremija buvo  $4,7 \times 10^7$  TV/ml, mažiausia –  $3,2 \times 10^3$  TV/ml, 44-57 metų amžiaus grupėje

didžiausia –  $4,5 \times 10^7$  TV/ml, mažiausia –  $3,9 \times 10^4$  TV/ml, o vyriausių (>57 m.) pacientų grupėje didžiausia pirminė viremija buvo  $6,8 \times 10^7$  TV/ml, mažiausia –  $2,4 \times 10^4$  TV/ml.

Apibendrinant tiriamųjų populiacijos pirminės viremijos priklausomybę nuo lyties ir amžiaus, tik viremijos vidurkis skyrėsi priklausomai nuo lyties ir buvo reikšmingai didesnis vyrų grupėje. Tyrime nustatytas didžiausias pirminės viremijos vidurkis buvo vyresnių nei 57 metų vyrų grupėje, o mažiausias vidurkis nustatytas to paties amžiaus moterų grupei. 5 pav. nurodytas tiriamųjų populiacijos pirminės viremijos vidurkių pasiskirstymas priklausomai nuo amžiaus grupės ir lyties.

Remiantis Stern ir kt. atliktu tyrimu [83], moterims HCV RNR titrai skiriasi priklausomai nuo amžiaus, o tiriant vyrus, šio ryšio tarp HCV viremijos ir amžiaus nebuvo rasta. Minėtame ir atliktame tyrimuose HCV viremija kito nepriklausomai nuo lyties ir amžiaus tarpusavio ryšio. Norint patvirtinti ar paneigti šią HCV viremijos priklausomybės nuo lyties ir amžiaus hipotezę, rekomenduotina atlikti platesnės apimties epidemiologinius tyrimus.



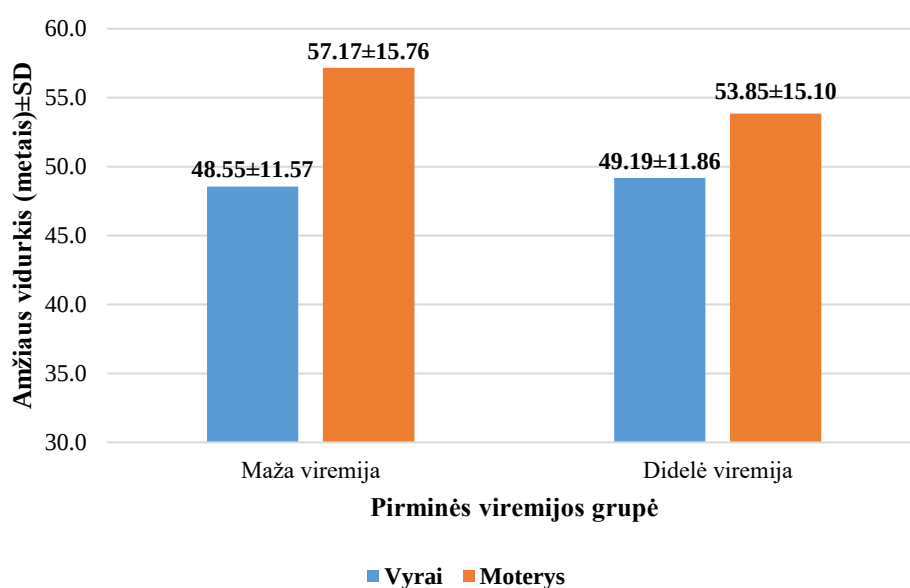
**5 pav. Pirminės viremijos vidurkių pasiskirstymas pagal amžiaus grupes ir lytį.**

Vertinant mažos ir didelės pirminės viremijos grupes, jos tarp vyrų ir moterų statistiškai reikšmingai nesiskyrė ( $\chi^2=2,454$ ,  $p=0,117$ ). Vyrų grupėje 18,6 proc. ( $n=22$ ) sudarė pacientai su maža viremija, 81,4 proc. ( $n=96$ ) pacientai su didele viremija, o moterų grupėje atitinkamai 28 proc. ( $n=23$ ) ir 72 proc. ( $n=59$ ). Tiriamųjų populiacijoje daugiausiai (48 proc.) atvejų nustatyta vyrų su didele viremija grupėje, o mažiausiai (11 proc.) aptikta vyrų su maža viremija grupėje. Atitinkami rezultatai galimi dėl populiacijoje didesnę dalį sudarančių vyriškos lyties tiriamųjų.

Analizuojant populiacijos amžiaus vidurkius mažos ir didelės pirminės viremijos grupėse, jie statistiškai reikšmingai nesiskyrė ( $p=0,387$ ). Mažos viremijos grupėje amžiaus vidurkis buvo  $53,0 \pm 14,4$  metai, vyriausias pacientas buvo 86 metų, o jauniausias – 31 metų. Didelės viremijos grupėje amžiaus vidurkis buvo  $51,0 \pm 13,3$  metai, vyriausias pacientas buvo 82 metų, o jauniausias – 22 metų.

Tiriamųjų populiacijoje pirminės viremijos grupių pasiskirstymas nepriklausė nuo amžiaus grupių. Daugiausiai (27,5 proc., n=55) populiacijoje nustatyta >57 metų amžiaus grupės su didele viremija, o mažiausiai (6,5 proc., n=13) – 44-57 metų amžiaus grupės su maža viremija pacientų.

Atliktame tyrime mažos ir didelės pirminės viremijos grupėse amžiaus vidurkis kito nepriklausomai nuo lyties. Tiriamųjų populiacijos amžiaus vidurkių pasiskirstymas pagal mažos ir didelės viremijos grupes bei lytį pavaizduotas 6 pav. Nors tarp viremijos grupių nebuvo rasta statistiškai reikšmingo amžiaus vidurkių skirtumo priklausomai nuo lyties, vyrų amžiaus vidurkis buvo mažesnis abiejose viremijos grupėse. Pagrindinė šio rezultato priežastis – jaunesnio amžiaus vyrai, dominuojantys tiriamųjų populiacijoje.



6 pav. Amžiaus vidurkių pasiskirstymas pagal pirminės viremijos grupes ir lytį.

### 3.5. HCV genotipų dažnis tiriamųjų populiacijoje priklausomai nuo lyties ir amžiaus

Siekiant įvertinti pagrindinių HCV genotipų dažnį tiriamųjų populiacijoje priklausomai nuo tiriamųjų lyties, atlikta statistinė analizė parodė, jog genotipų dažniai reikšmingai nesiskyrė tarp vyrų ir moterų ( $\chi^2=2,103$ ,  $p=0,349$ ). Vyrų ir moterų grupėse daugiausiai nustatyta 1 genotipų, atitinkamai 71 ir 56 atvejai. Mažiausiai populiacijoje nustatytų buvo 2 genotipų: 7 atvejai vyrų grupėje ir 6 atvejai moterų grupėje. 3 genotipo tarp lyčių pasiskirstymas: 40 tiriamųjų vyrų ir 20 tiriamųjų moterų grupėse.

Vertinant populiacijos genotipų/subtipų pasiskirstymą, įvairių HCV genotipų/subtipų dažnis statistiškai reikšmingai ( $\chi^2=19,369$ ,  $p=0,007$ ) aukštesnis buvo vyrų grupėje, lyginant su moterų grupe. Vyrams daugiausiai (n=40) nustatytas 3a subtipas, mažiausiai (n=1) – 2 ir 2b genotipai/subtipai.

Moterims daugiausiai (n=42) nustatytas 1b subtipas, mažiausiai (n=2) – 1a subtipas. Tiriamųjų populiacijoje didžiąją dalį sudarė vyrai su nustatytu 3a subtipu (20 proc.) ir moterys su nustatytu 1b subtipu (21 proc.). Panaši tendencija matoma Petruzzello ir kt. atlikto tyrimo rezultatuose [54], kuriuose 1b genotipas buvo dažnesnis tarp moterų nei tarp vyrų, o 3a genotipas dažnesnis vyrų tarpe. Atliktame tyrime 11 proc. statistiškai reikšmingai ( $\chi^2=5,988$ ,  $p=0,014$ ) daugiau 1 genotipo (vertinant tarp nustatytų genotipų/subtipų grupių) pacientų buvo vyrų nei moterų. 1b subtipo pacientų 25 proc. statistiškai reikšmingai ( $\chi^2=13,973$ ,  $p=0,00$ ) daugiau nustatyta moterų grupėje. Visas populiacijos genotipų/subtipų pasiskirstymas pagal lytis pateikiamas 6 lentelėje.

Mokslinių tyrimų [2,54,55,84,85] metu nustatyta, jog HCV genotipų/subtipų dažniai populiacijoje skiriasi priklausomai nuo lyties. Įvairių HCV genotipų/subtipų statistiškai reikšmingai dažniau buvo aptinkama vyrų grupėje. Tokiems rezultatams galėjo turėti įtaką didesnis vyrų, užsikrėtusių HCV, dažnis tiriamųjų populiacijoje.

**6 lentelė. Genotipų/subtipų pasiskirstymas tarp vyrų ir moterų.**

| Lytis          |                     | Genotipas/subtipas |       |       |            |       |       |       |       |
|----------------|---------------------|--------------------|-------|-------|------------|-------|-------|-------|-------|
|                |                     | 1                  | 1a    | 1a/1b | 1b         | 2     | 2a/2c | 2b    | 3a    |
| <b>Moterys</b> | Atvejų skaičius (n) | 4                  | 2     | 8     | 42         | 0     | 6     | 0     | 20    |
|                | proc. populiacijoje | 2,0                | 1,0   | 4,0   | 21,0       | 0,0   | 3,0   | 0,0   | 10,0  |
| <b>Vyrai</b>   | Atvejų skaičius (n) | 19                 | 3     | 19    | 30         | 1     | 5     | 1     | 40    |
|                | proc. populiacijoje | 9,5                | 1,5   | 9,5   | 15,0       | 0,5   | 2,5   | 0,5   | 20,0  |
|                | <i>p</i>            | <b>0,014</b>       | 0,963 | 0,196 | <b>0,0</b> | 0,403 | 0,347 | 0,403 | 0,149 |

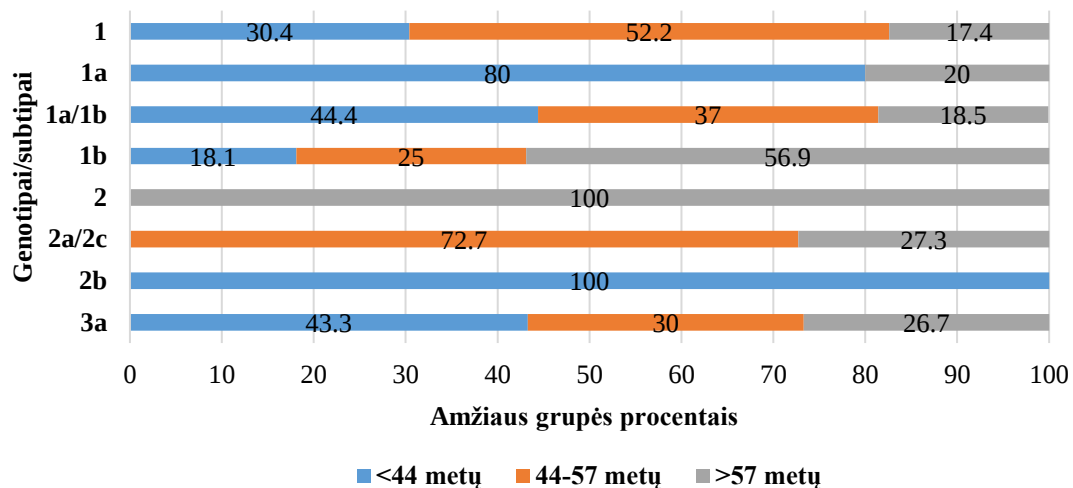
Tiriamųjų populiacijos amžiaus vidurkiai statistiškai reikšmingai ( $p=0,027$ ) skyrėsi tarp pagrindinių genotipų. GT 2 tiriamųjų amžiaus vidurkis ( $56,1\pm 11,5$  metai) buvo didžiausias tarp genotipų. Mažiausias amžiaus vidurkis,  $47,7\pm 13,0$  metai, nustatytas GT 3. Atlikus statistinę analizę nustatyta, jog 3 genotipą turintys tiriamieji buvo statistiškai patikimai ( $p=0,011$ ) jaunesni. Liakina ir kt. atliktame tyrime [78] nustatyta, jog tiriamieji, kuriems nustatytas 3 genotipas, buvo jaunesni nei turintys 1 arba 2 genotipą. To pačio tyrimo metu iširta, jog 3 genotipo HCV buvo perduodamas intraveninių narkotikų vartojimo metu, kuris šiuo metu yra labiausiai plintantis HCV perdavimo būdas ir dažnėja tarp jaunesnio amžiaus užkrėstųjų.

Vyriausias ir jauniausias populiacijos pacientai nustatyti 1 genotipo grupėje. Šiuos rezultatus galėjo nulemti neproporcingai didesnis nei kitų genotipų 1 genotipo dažnis tiriamųjų populiacijoje.

Siekiant tiksliau įvertinti priklausomybę tarp HCV genotipų ir amžiaus, buvo analizuojami amžiaus vidurkiai tarp tyrime nustatytų genotipų/subtipų grupių. Amžiaus vidurkiai statistiškai reikšmingai ( $p=0,00$ ) skyrėsi tarp nustatytų genotipų/subtipų grupių. Didžiausias amžiaus vidurkis ( $58,2\pm 9,8$  metai) nustatytas 2a/2c subtipo grupėje, o mažiausias vidurkis (32 metai) – 2b subtipo grupėje. Vyriausiui ir jauniausiui pacientams buvo nustatytas 1a/1b subtipas.

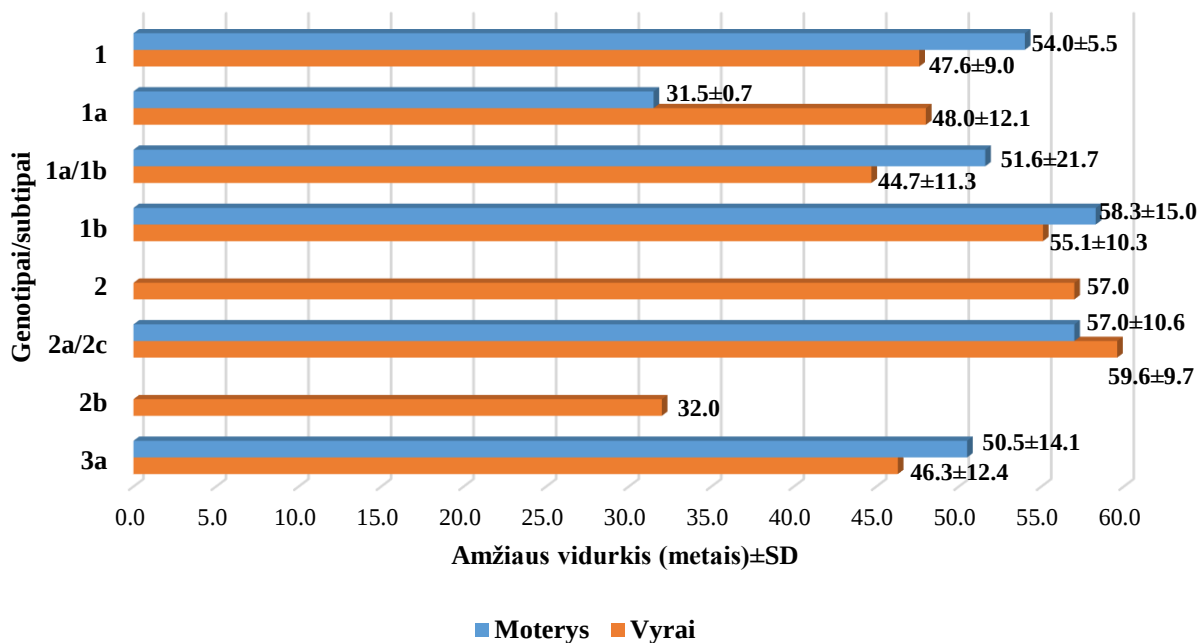
Tiriamųjų populiacijos genotipų dažnis grupėse statistiškai reikšmingai ( $\chi^2=11,043$ ,  $p=0,026$ ) skyrėsi tarp amžiaus grupių. Pacientų, turinčių GT 1, daugiausiai (40,2 proc.,  $n=51$ ) nustatyta  $>57$  metų amžiaus grupėje, o mažiausiai (28,3 proc.,  $n=36$ ) – jaunesnių nei 44 metų amžiaus grupėje. GT 2 daugiausiai (61,5 proc.,  $n=8$ ) turėjo 44-57 metų amžiaus pacientai, o mažiausiai (7,7 proc.,  $n=1$ ) –  $<44$  metų amžiaus pacientai. Su nustatytu GT 3 daugiausiai (43,3 proc.,  $n=26$ ) pacientų buvo  $<44$  metų amžiaus grupėje, o mažiausiai (26,7 proc.,  $n=16$ ) –  $>57$  metų amžiaus grupėje. Tiriamųjų populiacijoje dominavo vyresni nei 57 metų amžiaus pacientai, su nustatytu GT 1, sudarydami 25,5 proc. populiacijos.

Vertinant nustatytus genotipus/subtipus, jų dažnis statistiškai reikšmingai ( $\chi^2=46,112$ ,  $p=0,00$ ) skyrėsi tarp amžiaus grupių. 1b genotipo pacientų statistiškai reikšmingai ( $\chi^2=23,210$ ,  $p=0,00$ ) daugiausiai (56,9 proc.,  $n=41$ ) buvo vyresnių nei 57 metų amžiaus grupėje. 44-57 metų amžiaus grupėje statistiškai reikšmingai ( $p=0,009$ ) daugiau (72,7 proc.,  $n=8$ ) nustatyta 2a/2c subtipo pacientų, lyginant su kitomis amžiaus grupėmis. Tyrimo populiacijos amžiaus grupių pasiskirstymas pagal genotipus/subtipus pateikiamas 7 pav. Visoje tiriamųjų populiacijoje daugiausiai (36 proc.) sudarė vyresnių nei 57 metų amžiaus grupės pacientai, turintys 1b subtipą. Atitinkama tendencija buvo aptikta Italijoje atliktame moksliniame tyrime [54], kuriame nustatyta tiesioginė koreliacija tarp HCV genotipo ir amžiaus. 1b ir 2a/2c genotipai dažniausiai buvo aptinkami vyresnio amžiaus pacientų grupėje, o 1a ir 3a genotipai dažniau aptinkami jaunesniems pacientams. Minėtame tyrime teigiama, jog vyresnio amžiaus pacientų 1b genotipo dažnis susijęs su anksčiau tirtoje populiacijoje vyravusiu būtent vienintelio šio HCV genotipo paplitimu. Perėjimas nuo kadaise vyravusio HCV 1 genotipo, 1b subtipo į 3 genotipą, 3a subtipą yra tikėtinas Europoje [78].



7 pav. Amžiaus grupių pasiskirstymas pagal genotipus/subtipus.

Apibendrinant tiriamųjų populiacijos genotipų/subtipų pasiskirstymą pagal amžių ir lytį, šis pasiskirstymas buvo nepriklausomas nuo tiriamųjų amžiaus ir lyties tarpusavio ryšio. Vertinant amžiaus vidurkių pasiskirstymą pagal genotipus/subtipus ir lytį (8 pav.), didžiausias amžiaus vidurkis ( $59,6 \pm 9,7$  metai) priklausė 2a/2c subtipą turintiems vyrams, o mažiausias ( $31,5 \pm 0,7$  metai) buvo tarp 1a subtipą turinčių moterų.



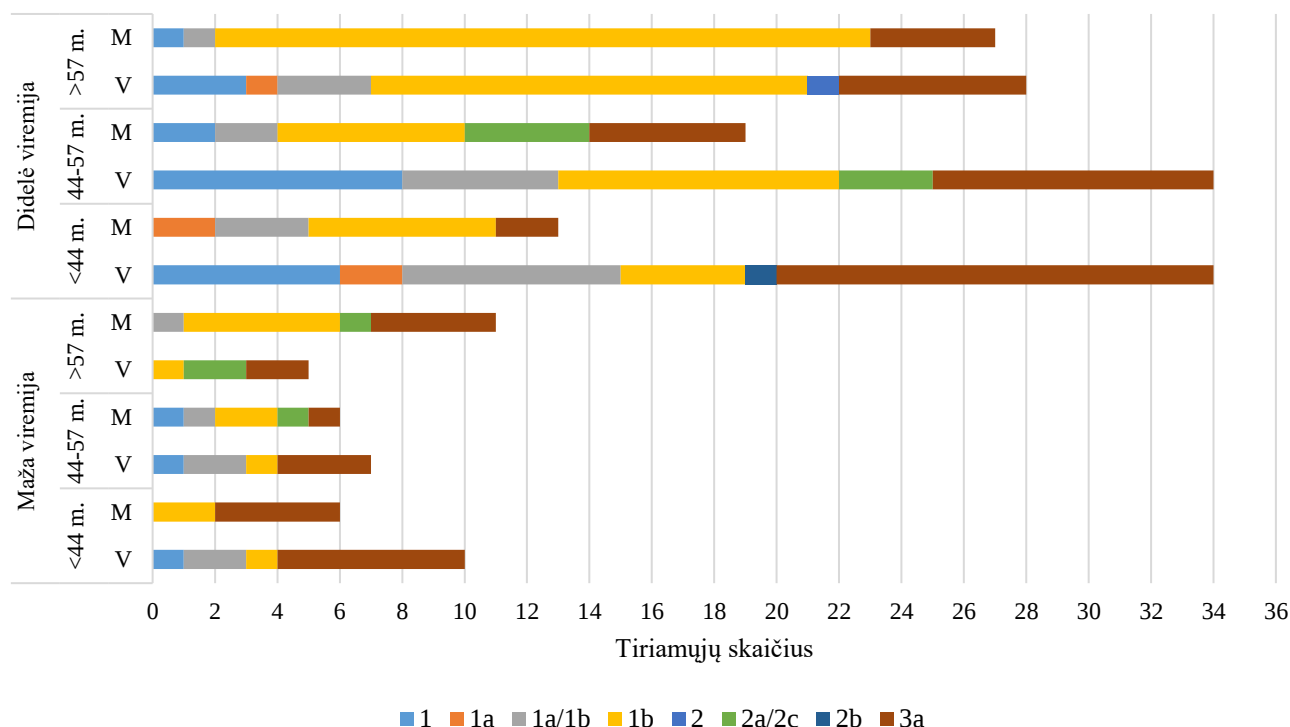
8 pav. Amžiaus vidurkių pasiskirstymas pagal genotipus/subtipus ir lytį.

### 3.6. Tyrimo rezultatų apibendrinimas

Apibendrinus visus rezultatus, daugiausiai tiriamųjų (n=21) populiacijoje nustatyta 1b subtipą, didelę viremiją turinčių, vyresnių nei 57 metai amžiaus, moterų grupėje. Antroje vietoje (n=14) – vyrų, turinčių 1b subtipą, didelę viremiją, esančių vyresnių nei 57 metų amžiaus, grupė bei vyrų, turinčių 3a subtipą, didelę viremiją, esančių jaunesnių nei 44 metai amžiaus, grupė. Visos tiriamųjų populiacijos pagal nustatytus HCV genotipus/subtipus, viremijos grupes, amžiaus grupes ir lytį pasiskirstymas pavaizduotas 9 pav.

HCV infekcijos progresavimo kintamumas priklauso nuo kelių veiksnių, tokių kaip lytis, amžius užsikrėtimo metu, viremija, užsikrėtimo būdas bei genotipas/subtipas. Antivirusinio gydymo rezultatas, HCV infekuotiems pacientams, koreliuoja su svarbiais prognozuojančiais veiksniais: klinikiniais radiniais, genotipais ir viremija [86]. Nustačius tiriamajai populiacijai būdingą HCV viremiją ir genotipų dažnį, bei jų priklausomumą nuo lyties ir amžiaus, galima prognozuoti atsaką į gydymą bei infekcijos vystymosi eigą.

Tyrimo buvo siekiama nustatyti HCV viremijos ir genotipų pasiskirstymą populiacijoje bei jų priklausomumą nuo tokių veiksnių kaip tiriamųjų lytis ir amžius. Atlikta retrospektyvinė analizė leido įvertinti populiacijos duomenis ir pateikti statistinius rezultatus.



9 pav. Populiacijos genotipų/subtipų pasiskirstymas pagal viremijos ir amžiaus grupes bei lytį.

V – vyrai, M – moterys

HCV viremija yra vienas pagrindinių, infekciją apibūdinančių, požymių, naudinga stebint atsaką į gydymą ir atkryčio dažnį, todėl buvo pasirinkta įvertinti tiriamųjų populiacijoje. Atliktame tyrime buvo nustatyta beveik 3 kartus daugiau tiriamųjų, turinčių didelę viremiją ( $>6,0 \times 10^5$  TV/ml) (viremija buvo skirstoma į mažą ir didelę pagal LR Sveikatos ministro įsakyme pateiktas rekomendacijas). Lyginant su kitais tyrimais, rezultatai gali žymiai skirtis ne tik dėl suskirstymo būdo, bet ir dėl tam tikrai populiacijai būdingo viremijos lygio. Dėl šios priežasties palyginimui buvo pasirinktas tyrimas [77], analizuojantis Lietuvos populiacijos HCV viremiją, kuriame atitinkamai rasta daugiau didelės viremijos atvejų. Norint nustatyti, ar Lietuvoje vyrauja didelė HCV viremija ir kokios to priežastys, reikėtų ištirti didesnę tiriamųjų populiaciją ir įvertinti daugiau epidemiologinių duomenų.

Moksliniuose tyrimuose [43,80,82] nustatyta, jog HCV viremija nekoreliuoja su tiriamųjų lytimi. Ši hipotezė yra paneigiama kitų tyrimų rezultatais ir didesnė viremija aptinkama vyrams. Atliktame tyrime rastas reikšmingai didesnis viremijos vidurkis vyrų grupėje. Šis rezultatas galimai gautas tiriamųjų populiacijoje dominuojant vyriškos lyties tiriamiesiems, tačiau didesni vyrų HCV RNR titrai siejami ir su kitomis priežastimis, kaip pavyzdžiui, su didesne tikimybe vyrams išvystyti lėtinę HCV infekciją, mažesne galimybe virusui spontaniškai pašalinti iš organizmo ir kt. Didesnio HCV viremijos vidurkio sąsajos su vyriška lytimi patvirtinti, rekomenduojama ištirti populiaciją, kurią sudaro panašiai proporcingas tiriamų moterų ir vyrų kiekis.

Atliktame tyrime HCV viremija nekoreliavo su amžiumi. Nors nemaža dalis mokslinių tyrimų nenustatė ryšio tarp HCV viremijos ir tiriamųjų amžiaus, kitų tyrimų rezultatai parodė, jog ryšys egzistuoja. Pavyzdžiui, Mushtaq ir kt. tyrime [87] nustatyta, jog HCV viremija didėja su didėjančiu amžiumi. Ištyrus didesnės tiriamųjų imties populiaciją, būtų galima tiksliau įvertinti viremijos ir amžiaus ryšį. Išsami HCV viremijos ir amžiaus koreliacijos analizė leistų prognozuoti atsaką į antivirusinį gydymą, infekcijos progresavimą, atsižvelgiant į pacientų amžių, kaip į vieną svarbiausių rodiklių.

Tiriamosioje populiacijoje apie du trečdalius sudarė HCV GT 1, kiek mažiau buvo GT 3 atvejų ir likusią nedidelę dalį sudarė GT 2. Atitinkamai išsidėstęs pasiskirstymas nustatytas ir tyrime [88], analizuojančiame HCV genotipų paplitimą Lietuvos populiacijoje. Atliktame tyrime dažniausias HCV genotipas/subtipas buvo 1b, kuris nustatytas daugiau nei trečdaliui tiriamųjų, 6 proc. mažiau nustatyta tiriamųjų su 3a subtipu. Mokslininkai [78] aiškina, jog pastaraisiais metais kintantys HCV perdavimo būdai lėmė vyraujančio genotipo poslinkį iš GT 1 link GT 3. Atliekant periodišką populiacijos studijas, būtų galima stebėti vyraujančių HCV genotipų paplitimo pokyčius, kaip pavyzdžiui, atliktose studijose Italijoje [50,54].

Nustatytų HCV genotipų/subtipų dažniai buvo skirtingi priklausomai nuo lyties tiriamųjų populiacijoje. Labiausiai paplitęs 1b subtipas buvo dažniau aptinkamas moterims, kas nustatyta ir kitų mokslininkų atliktuose tyrimuose [54,55]. 3a subtipas buvo dažniau nustatomas vyrams, tai rodo ir kitų [2,50,54,85] tyrimų rezultatai. Tokį genotipų pasiskirstymą tarp lyčių galėjo lemti HCV perdavimo

būdai. HCV GT 1 dažniausiai perduodamas chirurginių procedūrų, kraujo perpylimo metu, o GT 3 linkęs plisti intraveninius narkotikus vartojančiųjų tarpe. Nors teigti, jog tam tikras HCV plitimo kelias būdingas tik moterims ar vyrams, būtų netikslu, genotipų pasiskirstymas priklausomai nuo lyties dažniausiai aiškinamas pagal viruso perdavimo būdą.

Atlikto tyrimo rezultatai parodė, jog tiriamųjų amžiaus vidurkis reikšmingai skyrėsi tarp nustatytų genotipų, o taipogi genotipų dažniai buvo skirtingi tarp amžiaus grupių. Pacientai, su nustatytu GT 3, buvo reikšmingai jaunesni nei turintys kitus genotipus. Atitinkami rezultatai gauti ir kituose moksliniuose tyrimuose [50,54,78], o jų priežastimi įvardijama tam tikri HCV infekcijos rizikos faktoriai ir perdavimo būdai, paplitę jaunesnių pacientų tarpe. Santykinai jaunesniems pacientams intraveninių narkotikų vartojimas ir tatuiravimas dažniau įvardijami kaip infekcijos perdavimo keliai, o vyresniems pacientams – operacijos ir ilgos/daugybines hospitalizacijos [78]. 1b subtipas statistiškai reikšmingai dažniau buvo nustatomas vyresnio amžiaus (>57 metų) pacientų grupei, o prieš tai minėtų perdavimo būdų sąsaja su 1b subtipu ir amžiumi patvirtina būtent šį subtipą esant būdingą vyresniems pacientams. Apibendrinus gautus rezultatus galima daryti išvadą, jog HCV infekciją turinčių pacientų amžius susijęs su tam tikru genotipu, būdingu atitinkamai amžiaus grupei. Pagal kitų mokslinių tyrimų rezultatus labiausiai tikėtina HCV genotipų ir amžiaus sąsajos priežastimi yra HCV perdavimo būdai tipiški genotipams.

Diagnozuojant hepatito C infekciją, HCV viremija ir genotipas yra svarbiausi veiksniai, pagal kuriuos galima prognozuoti infekcijos eigą ir baigtį. Ištyrus šiuos veiksnius tiriamųjų populiacijoje nustatyta, jog genotipų dažniai reikšmingai skyrėsi priklausomai nuo lyties ir amžiaus, tačiau nerasta ryšio tarp viremijos ir tiriamųjų lyties bei amžiaus. Ieškant hepatito C gydymo strategijos, genotipas išlieka svarbiausiu aspektu, pagal kurį pritaikomas vaistų skyrimas, o pacientų lytis ir amžius papildomai gali koreguoti gydymą. Genotipas bei lytis ir amžius yra neatsiejami nuo taikomo gydymo, gali padėti prognozuoti ligos eigą, todėl atlikto tyrimo rezultatai gali būti taikomi tolimesniam gydymo efektyvumo tyrimui bei padėti suprasti HCV infekcijos genotipo ryšį su ligos baigtimi.

Didesnės tiriamųjų imties analizė leistų patikslinti, ar yra HCV viremijos koreliacija su tiriamųjų lytimi ir amžiumi, ir jei taip, kokia viremija būdinga tam tikrai tiriamųjų grupei. Šis tyrimas suteiktų žinių apie prognozuojamą infekcijos eigą, ne tik atsižvelgiant į viremijos lygį, bet ir tiriamųjų lytį bei amžių. Tai padėtų ankstyvame hepatito C infekcijos diagnostikos laikotarpyje nuspėti ligos baigties variantus ir priimti asmenines pacientui gydymo strategijas. Išsamesniam epidemiologiniam tyrimui atlikti, prie ištirtų faktorių rekomenduojama prijungti pacientų klinikinius požymius bei daugiau laboratorinių tyrimų rezultatų. Išsamesnis tyrimas leistų aptikti daugiau koreliacijų tarp hepatito C infekcijos ir tiriamųjų požymių, kas padėtų kurti dar efektyvesnes gydymo strategijas.

## IŠVADOS

1. Nustatytas pirminės viremijos vidurkis tiriamųjų populiacijoje –  $6,9 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^7$  TV/ml. 55 proc. daugiau tiriamųjų turėjo didelę viremiją.
2. Tiriamųjų populiacijoje 63,5 proc. nustatyta HCV 1 genotipų, perpus mažiau – 3 genotipų, mažiausiai – 2 genotipų. Dažniausi HCV genotipai/subtipai buvo 1b, apimantis daugiau nei trečdalį populiacijos, 3a, 1a/1b, 1, o rečiausi buvo 2a/2c, 1a, 2b ir 2.
3. Statistiškai reikšmingai didesnis pirminės viremijos vidurkis nustatytas vyrams, nepriklausomai nuo amžiaus. Tiriamųjų populiacijoje nustatytų HCV genotipų/subtipų dažnis skyrėsi priklausomai nuo lyties (daugiau 1 genotipo vyrų, 1b subtipo moterų). Genotipų dažnių pasiskirstymas priklausė nuo amžiaus grupių, 3 genotipas buvo nustatomas jaunesniems tiriamiesiems.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Kumar T, Ahmad N, Hayat MK, Gao BX, Faisal S, Ilahi N, et al. Prevalence and Genotypic Distribution of Hepatitis C Virus in Peshawar KPK, Pakistan. HAYATI Journal of Biosciences 2017; 24: 22-25.
2. Janahi EM, Al-Mannai M, Singh H, Jahromi MM. Distribution of Hepatitis C Virus Genotypes in Bahrain. Hepatitis Monthly 2015; 15(12):e30300.
3. Moosavy SH, Dvoodian P, Nazarneshad MA, Nejatizadeh A, Eshkezar E, Mahboobi H. Epidemiology, transmission, diagnosis, and outcome of Hepatitis C virus infection. Electronic Physician 2017; vol. 9, p. 5646–5656.
4. Jia W, Weng J, Fang C, Li Y. A dynamic model and some strategies on how to prevent and control hepatitis c in mainland China. BMC Infect Dis. 2019;19(1):1-11.
5. Kermani FR., Hosseini KM., Kafi-Abad SA., Mansournia MA., Sharifi Z., Maghsudli M. Hepatitis C (HCV) Viremic rate and its correlation to demographic factors among HCV confirmed Iranian blood donors. Archives of Iranian Medicine 2019; 22(2):76-79.
6. Li HC, Lo SY. Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and treatment. World Journal of Hepatology 2015; 7(10): 1377–1389.
7. Rouabhi S, Sadelaoud M, Mokrane KC, Toumi W, Abenavoli L. Hepatitis C virus genotypes in north eastern Algeria: A retrospective study. World Journal of Hepatology 2013; 5(7): 393-397.
8. Al Zayed RM, Hamdy NM, Al-Ajlan HH, Aref NM. Prevalence of HCV genotypes and viral load in Saudi Arabia. International Journal of Internal Medicine 2015; 4(2): 26-41.
9. Saeed, U., Waheed, Y. and Ashraf, M. Hepatitis B and hepatitis C viruses: a review of viral genomes, viral induced host immune responses, genotypic distributions and worldwide epidemiology. Asian Pacific Journal of Tropical Disease 2014; 4(2), p.88-96.
10. Adams R, Pirakitikulr N, Pyle A. Functional RNA structures throughout the Hepatitis C Virus genome. Current Opinion in Virology 2017; p. 76-86.
11. Ramia S, Eid-Fares J. Distribution of hepatitis C virus genotypes in the Middle East. Int J Infect Dis. 2006;10(4):272–7.
12. Kim CW, Chang KM. Hepatitis C virus: virology and life cycle. Clinical and Molecular Hepatology 2013; 19(1):17-25.
13. Ganta NM, Gedda G, Rathnakar B, Satyanarayana M, Yamajala B, Ahsan MJ et al. A review on HCV inhibitors: Significance of non-structural polyproteins. European Journal of Medicinal Chemistry 2019; Vol. 164, p. 576-601.

14. Bukh J. The history of hepatitis C virus (HCV): Basic research reveals unique features in phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspectives for epidemic control. *Journal of Hepatology* 2016; Vol. 65, S2-S21.
15. Mauger DM, Golden M, Yamane D, Williford S, Lemon SM, Martin DP, et al. Functionally conserved architecture of hepatitis C virus RNA genomes. *PNAS* 2015; 112(12):3692-7.
16. Jafri SM, Gordon SC. Epidemiology of Hepatitis C. *Clinical Liver Disease* 2018; 12(5): 140-142.
17. Sokal E, Nannini P. Hepatitis C virus in children: the global picture. *Archives of Disease in Children* 2017; 102:668–671.
18. Hepatitis C [elektroninis išteklius] [žiūrėta 2019 m. gruodžio 4 d.]. Prieiga per internetą: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>.
19. Petruzzello A., Marigliano S., Loquercio G., Cacciapuoti C. Hepatitis C virus (HCV) genotypes distribution: an epidemiological up-date in Europe. *Infectious Agents and Cancer* 2016. 11(1):53.
20. Petruzzello A., Marigliano S., Loquercio G., Cozzolino A., Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: an up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World Journal of Gastroenterology* 2016; 22(34): 7824-7840.
21. Liakina V, Valantinas J. Anti-HCV prevalence in the general population of Lithuania. *Medical Science Monitor* 2012; 18(3):PH28-35.
22. Baden R., Rockstoh JK., Buti M. Natural History and Management of Hepatitis C: Does Sex Play a Role?. *The Journal of Infectioctious Diseases* 2014; 209(S3):S81–5.
23. Thrift AP, El-Serag HB, Kanwal F. Global epidemiology and burden of HCV infection and HCV-related disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 2017; 14(2):122-132.
24. Morozov VA., Lagaye S. Hepatitis C virus: Morphogenesis, infection and therapy. *World Journal of Hepatology* 2018; 10(2):186-212.
25. Puchades Renau L, Berenguer M. Introduction to hepatitis C virus infection: Overview and history of hepatitis C virus therapies. *Hemodialysis International* 2018; 22:S8-S21.
26. Coppola N, Alessio L, Onorato L, et al. Epidemiology and management of hepatitis C virus infections in immigrant populations. *Infectious Diseases of Poverty* 2019; 8(1):17.
27. Preciado M, Valva, P, Gutierrez, P, Rahal P, Ruiz-Tovar K, Yamasaki L. et al. Hepatitis C virus molecular evolution: Transmission, disease progression and antiviral therapy. *World Journal of Gastroenterology* 2014; 20(43):15992-16013.
28. Shahriari-Fard F, Alavian SM, Farajzadegan Z, Rabiei A, Ataei B, Ataie M. Assessment of hepatitis C risk factors in center of Iran: A case–control study. *Journal of Research in Medical Sciences* 2018; 23: 87.
29. Kushner T., Terrault NA. Hepatitis C in Pregnancy: A Unique Opportunity to Improve the Hepatitis C Cascade of Care. *Hepatology Communications* 2019; 3:1.

30. Tosone, G., Maraolo, AE, Mascolo, S., Palmiero, G., Tambaro, O., Orlando, R. Vertical hepatitis C virus transmission: Main questions and answers. *World Journal of Hepatology* 2014; 6(8): 538-548.
31. Knighton S. Hepatitis C: clinical features and diagnosis. *Clinical Pharmacist* 2013, Vol 5.
32. Petruzzello A. Epidemiology of Hepatitis B Virus (HBV) and Hepatitis C Virus (HCV) Related Hepatocellular Carcinoma. *The Open Virology Journal* 2018; 12:26–32.
33. Dėl lėtinio virusinio hepatito C diagnostikos ir ambulatorinio gydymo kompensuojamaisiais vaistais tvarkos aprašo patvirtinimo. Lietuvos Respublikos sveikatos apsaugos ministro 2012 m. spalio 24 d. įsakymas Nr. V-960.
34. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. *Journal of Hepatology* 2018; 69: 461–511.
35. Ayoub HH, Chemaitelly H, Omori R, Abu-Raddad LJ. Hepatitis C virus infection spontaneous clearance: Has it been underestimated? *International Journal of Infectious Diseases* 2018; 75:60-66.
36. Hajarizadeh B, Grady B, Page K, Kim AY, McGovern BH, Cox AL, et al. Patterns of Hepatitis C Virus RNA Levels during Acute Infection: The InC3 Study. *PLoS ONE* 2015; 10(4): e0122232.
37. Barrera JM. Diagnostic tests for hepatitis C virus infection. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2000; 15(8): 15-18.
38. Hahn JA, Tully DC, Evans JL, Morris MD, Briceno A, Bean DJ et al. Role of HCV Viremia in Corroborated HCV Transmission Events Within Young Adult Injecting Partnerships. *Open Forum Infectious Diseases* 2019; 6(4):ofz125.
39. Harfouche M, Chemaitelly H, Kouyoumjian SP, Mahmud S, Chaabna K, Al-Kanaani Z, et al. Hepatitis C virus viremic rate in the Middle East and North Africa: Systematic synthesis, meta-analyses, and meta-regressions. *PLoS ONE* 2017; 12(10):e0187177.
40. Gretch DR. Diagnostic tests for hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26(3): 43-47.
41. Noh R, Lee DH, Kwon BW, Kim YH, Kim SB, Song IH. Clinical impact of viral load on the development of hepatocellular carcinoma and liver-related mortality in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology Research and Practice* 2016; 2016: 7476231.
42. Jamalidoust M, Namayandeh M, Moghadami M, Ziyaeyan M. Comparison of HCV viral load and its genotype distributions in HCV mono- and HIV/HCV co-infected illicit drug users. *Virology Journal* 2017; 14: 127.
43. Schijman, A., Colina, R., Mukomolov, S., Kalinina, O., Garcia, L., Broor, S., et al. Comparison of Hepatitis C Viral Loads in Patients with or without Coinfection with Different Genotypes. *Clinical and Vaccine Immunology* 2004; 11(2), 433-435.
44. Martinot-Peignoux M, Stern C, Maylin S, Ripault MP, Boyer N, Leclerc L, et al. Twelve weeks posttreatment follow-up is as relevant as 24 weeks to determine the sustained virologic response in

- patients with hepatitis C virus receiving pegylated interferon and ribavirin. *Hepatology* 2010; 51(4):1122–6.
45. Tsukiyama-Kohara K., Kohara M. Hepatitis C Virus: Viral Quasispecies and Genotypes. *International Journal of Molecular Sciences* 2018; 19, 23.
  46. Lai TS, Lee MH, Yang HI, You SL, Lu SN, Wang LY, et al. Hepatitis C Viral Load, Genotype, and Increased Risk of Developing End-Stage Renal Disease: REVEAL-HCV Study. *Hepatology* 2017; 66(3): 784-793.
  47. Chantratita W, Song KS, GunHo C, Pongthanapisith V, Thongbaiphet N, Wongtabtim G, et al. 6 HCV genotyping 9G test and its comparison with VERSANT HCV genotype 2.0 assay (LiPA) for the hepatitis C virus genotyping. *Journal of Virological Methods* 2017; 239:1-8.
  48. Guidelines for the care and treatment of persons diagnosed with chronic hepatitis C virus infection. Geneva: World Health Organization; 2018.
  49. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A., Cooke GS, Pybus OG., Barnes E. Global Distribution and Prevalence of Hepatitis C Virus Genotypes. *Hepatology* 2015; 61:77-87.
  50. Petruzzello A, Sabatino R, Loquercio G, Guzzo A, Di Capua L, Labonia F, et al. Nine-year distribution pattern of hepatitis C virus (HCV) genotypes in Southern Italy. *PLoS ONE* 2019; 14(2): e0212033.
  51. Axley P, Ahmed Z, Ravi S, Singal AK. Hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma: a narrative review. *Journal of Clinical and Translational Hepatology* 2018; 6(1): 79–84.
  52. Gower, E., Estes, C., Blach, S., Razavi-Shearer, K., Razavi, H. Global epidemiology and genotype distribution of hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology* 2014; vol. 61, p. 45-57.
  53. Wilson EM, Rosenthal ES, Kattakuzhy S, Tang L, Kottlil S. Clinical laboratory testing in the era of directly acting antiviral therapies for hepatitis C. *Clinical Microbiology Reviews* 2017; 30:23–42.
  54. Petruzzello A, Coppola N, Diodato AM, Iervolino V, Azzaro R, Costanzo G, et al. Age and Gender Distribution of Hepatitis C Virus Genotypes in the Metropolitan Area of Naples. *Intervirology* 2013; 56(3):206-12.
  55. Niu Z, Zhang P, Tong Y. Age and gender distribution of Hepatitis C virus prevalence and genotypes of individuals of physical examination in WuHan, Central China. *Springerplus* 2016; 5(1):1557.
  56. Gupta E, Bajpai M, Choudhary A. Hepatitis C virus: Screening, diagnosis, and interpretation of laboratory assays. *Asian Journal of Transfusion Science* 2014; 8(1): 19-25.
  57. Getchell JP, Wroblewski KE, DeMaria A, Bean CL, Parker MM, Pandori M, et al. Testing for HCV infection: an update of guidance for clinicians and laboratorians identifying current HCV infections. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 2013; 62(18): 362-365.

58. Fourati S, Feld JJ, Chevaliez S, Luhmann N. Approaches for simplified HCV diagnostic algorithms. *Journal of the International AIDS Society* 2018; 21:e25058.
59. Lok AS, Gunaratnam NT. Diagnosis of Hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26(3): 48-56.
60. Kamili S, Drobeniuc Jan, Araujo AC, Hayden TM. Laboratory diagnostics for hepatitis C virus infection. *Clinical Infectious Diseases* 2012; 55(S1):S43–8.
61. Villar LM, Cruz HM, Barbosa JR, Bezerra CS, Portilho M, Scalioni LP. Update on hepatitis B and C virus diagnosis. *World Journal of Virology* 2015; 4(4): 323-342.
62. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Diagnosis and management of chronic viral hepatitis: Antigens, antibodies and viral genomes. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology* 2008; 22(6): 1031-1048.
63. Mukherjee R, Burns A, Rodden D, Chang F, Chaum M, Garcia N, et al. Diagnosis and Management of Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Laboratory Automation* 2015; 20(5): 519-538.
64. Jorgensen PA, Neuwald PD. Standardized hepatitis C virus RNA panels for nucleic acid testing assays. *Journal of Clinical Virology* 2001; 20 (1-2):35-40.
65. Chevaliez S. Virological tools to diagnose and monitor hepatitis C virus infection. *Clinical Microbiology and Infection* 2011; 17: 116-121.
66. Xiang Y, Lai X, Chen P, Yang Y. The correlation of HCV RNA and HCV core antigen in different genotypes of HCV. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 2019; 33(1): e22632.
67. Cuypers L, Thijssen M, Shakibzadeh A, Sabahi F, Ravanshad M, Reza Pourkarim M. Next-generation sequencing for the clinical management of hepatitis C virus infections: does one test fits all purposes?, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 2019; 56(6): 420-434.
68. Chueca N, Rivadulla I, Lovatti R, Reina G, Blanco A, Fernandez-Caballero JA, et al. Using NS5B sequencing for hepatitis C virus genotyping reveals discordances with commercial platforms. *PLoS ONE* 2016; 11(4): e0153754.
69. Gowin E, Bereszynska I, Adamek A, Kowala-Piaskowska A, Mozer-Lisewska I, Wysocki J, et al. The prevalence of mixed genotype infections in Polish patients with hepatitis C. *International Journal of Infectious Diseases* 2016; 43: 13–16.
70. Firdaus R, Saha K, Biswas A, Sadhukhan PC. Current molecular methods for the detection of hepatitis C virus in high risk group population: A systematic review. *World Journal of Virology* 2015; 4(1):25-32.
71. Stelzl E, Appel HM, Mehta R, Marins EG, Berg J, Paar C et al. Evaluation of the new cobas® HCV genotyping test based on real-time PCRs of three different HCV genome regions. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2017; 55(4): 517–521.

72. Saludes V, Gonzalez V, Planas R, Matas L, Ausina V, Martro E. Tools for the diagnosis of hepatitis C virus infection and hepatic fibrosis staging. *World Journal of Gastroenterology* 2014; 20(13): 3431-3442.
73. Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology* 2004; 40(1): 1147-1171.
74. Olmstead AD, Lee TD, Chow R, Gunadasa K, Auk B, Krajden M, Jassem AN. Development and validation of a real-time, reverse transcription PCR assay for rapid and low-cost genotyping of hepatitis C virus genotypes 1a, 1b, 2, and 3a. *Journal of Virological Methods* 2017; 244: 17–22.
75. Mahmood N, Ali S, Afridi J, Ahmad B, Ali I, Jalil F. Real Time PCR Based Detection of Hepatitis C Virus Major Genotypes in Chronic HCV Patients in Khyber Pakhtunkhwa. *Journal of Microbiology* 2018; 11(12):e80931.
76. Ali A, Nisar M, Ahmad H, Saif N, Idrees M, Bajwa M. Determination of HCV genotypes and viral loads in chronic HCV infected patients of Hazara Pakistan. *Virology Journal* 2011; 8:466.
77. Speičienė D, Kotovienė L, Mickevičius A, Liakina V, Valantinas J. Sergančiųjų lėtiniu virusiniu C hepatitu gydymo pegiliuotu interferonu ir ribavirinu efektyvumas klinikinėje praktikoje. *Medicinos Teorija ir Praktika* 2014; 21(1):23–32. doi:10.15591/mtp.2015.004
78. Liakina V, Speičienė D, Irnius A, Valantinas J. Changes in hepatitis C virus infection routes and genotype distribution in a Lithuanian cohort with chronic hepatitis C. *Medical Science Monitor*. 2009; 15(4):17–23.
79. Bhattacharjee D, Mukherjee K, Chakroborti G, Ghosh R, Mandal N, Bose M. Correlation Study Between HCV Genotypes Distribution Pattern and Viral Load in a Tertiary Care Hospital in Kolkata, India. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2015; 9(5):DC15-7.
80. Salim Z, Al-Khalidi SJ, Ahmed AM. Distribution pattern of HCV genotypes and subgenotypes and their association with viral load in group of Iraqi patients with chronic HCV infection. *World Journal of Pharmaceutical Research* 2016; 5(11):261-268.
81. Rong X, Lu L, Wang J, Xiong H, Huang J, et al. Correlation of viral loads with HCV genotypes: Higher levels of virus were revealed among blood donors infected with 6a strains. *PLoS ONE* 2012; 7(12): e52467.
82. Hadinedoushan H, Salmanroghani H, Amirbaigy MK, Akhondi-Meybodi M. Hepatitis C virus genotypes and association with viral load in Yazd, central province of Iran. *Hepatitis Monthly* 2014; 14(3):e11705.
83. Stern C, Moucari R, Cardoso A, Martinot-Peignoux M, Boyer N, Ripault M, et al. Influence of gender on viral load according to age in patient with chronic hepatitis C: a possible effect on hormonal factors. *Journal of Hepatology*, 2009; 50, S158.

84. Amer K, Maryam S, Wajeeha A. Genetic diversity of hepatitis C and gender predisposition: a cross-sectional study. *Pakistan Journal of Physiology* 2018 ; 14(1):37-9.
85. Gioula G, Sinakos E, Gigi E, Goulis I, Vasiliadis T, Minti F, et al. Distribution of Hepatitis C Virus genotypes in northern Greece in the last decade: descriptive analysis and clinical correlations. *Global Health, Epidemiology and Genomics* 2019; 4: e5, 1–4.
86. Al-abadi B, Al-hiary M, Khasawneh R, Bani-Salameh A, Al-saeidat S, Nouar ZA, et al. Frequency of hepatitis C virus genotypes and genotype association with hepatitis C virus load, age and gender, King Hussein Medical Center experience. *Journal of the Royal Medical Services* 2018; 25(3).
87. Mushtaq A, Tariq MA, Rasheed U, Afroz A, Zeeshan N, Asif AR, et al. Estimation of HCV viral load and liver enzymes among different patients groups of District Gujrat, Pakistan. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 2013; 4(9): 866-871
88. Stiklerytė A, Norder H, Abrutienė J, Magnus LO, Ambrozaitis A. Prevalence of hepatitis C virus (HCV) genotypes in Lithuania. *Journal of Clinical Virology* 2006; 36(3): S37.

# PRIEDAI

1 priedas.



LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

BIOETIKOS CENTRAS

Kodas 302536989, Tilžės g. 18, LT- 47181, Kaunas, tel.: (8 37) 327233, [www.lsmuni.lt](http://www.lsmuni.lt), el.p.: [bioetika@lsmuni.lt](mailto:bioetika@lsmuni.lt)

Medicinos akademijos (MA)  
Antrosios pakopos studijų programa –  
Laboratorinės medicinos biologija  
I k. magistrantei Eglei Dovydaitytei  
Darbo vadovė prof. Astra Vitkauskienė  
LSMUL KK Laboratorinės medicinos klinika

2019-03-08

Nr. *BEC-LHB(M)-339*

## DĖL PRITARIMO TYRIMUI

LSMU Bioetikos centras, įvertinęs Eglės Dovydaitytės pateiktus dokumentus, magistrantės tiriamajam darbui tema „Hepatito C viremija ir genotipų dažnis tiriamųjų populiacijoje“ pritaria\*.

*Dr. Zydronė Lincevičiūtė*  
*Lincevičiūtė*

\* Pastaba: šis pritarimas neatleidžia tiriamąjį mokslinį darbą vykdančių asmenų nuo prievolės laikytis Bendrojo duomenų apsaugos reglamento nuostatų ir nuo atsakomybės gauti nacionalinio arba regioninio bioetikos komiteto leidimą, jei toks leidimas būtinas pagal LR Biomedicininį tyrimų etikos įstatyme numatytus reikalavimus.