



DETEKCIJA HEPATITIS C VIRUSA: ULOGA AUTOMATIZOVANIH SISTEMA U LABORATORIJAMA ZA MOLEKULARNU DIJAGNOSTIKU

DETECTION OF HEPATITIS C VIRUS: THE ROLE OF AUTOMATED SYSTEMS IN MOLECULAR DIAGNOSTIC LABORATORIES

Kasandra Galić, *Fakultet tehničkih nauka, Novi Sad*

Oblast – BIOMEDICINSKO INŽENJERSTVO

Kratka sadržaj – Ovaj rad se fokusira na analizu uloge automatizovanih PCR sistema u dijagnostici hepatitisa C virusa (HCV) u kliničkim laboratorijama. Istražićemo osnovne principe PCR metodologije, korake pripreme uzoraka, kao i prednosti koje automatizovani sistemi donose u dijagnostičkim procedurama. Takođe, biće prikazani rezultati analize uzoraka pacijenata, uz diskusiju o mogućim strategijama za unapređenje dijagnostičke prakse. Cilj rada jeste doprineti boljem razumevanju i primeni savremenih tehnologija u dijagnostici HCV-a.

Ključne reči: *Hepatitis C virus, PCR, automatizovani sistemi, molekularna laboratorijska dijagnostika*

Abstract – This paper focuses on analyzing the role of automated PCR systems in the diagnosis of hepatitis C virus (HCV) in clinical laboratories. We will explore the basic principles of PCR methodology, the steps involved in sample preparation, and the advantages that automated systems bring to diagnostic procedures. Additionally, the results of patient sample analyses will be presented, along with a discussion on potential strategies for improving diagnostic practices. The aim of this work is to contribute to a better understanding and application of modern technologies in HCV diagnostics.

Keywords: *Hepatitis C virus, PCR, automated systems, diagnostics, sample preparation*

1. UVOD

Hepatitis C virus (HCV) predstavlja značajan globalni zdravstveni problem [1], sa procenjenim brojem zaraženih od 71 milion ljudi širom sveta. Ova infekcija može dovesti do ozbiljnih zdravstvenih komplikacija, uključujući cirozu i hepatocelularni karcinom, što naglašava hitnu potrebu za efikasnim dijagnostičkim metodama. U poslednjim decenijama, napredak u molekularnim tehnikama, posebno u oblasti polimerazne lančane reakcije (PCR), omogućio je bržu i precizniju detekciju HCV-a.

Ovaj rad istražuje ulogu automatizovanih PCR sistema u kliničkim laboratorijama, koji su postali ključni alati u dijagnostici HCV infekcija. Automatizacija procesa ne samo da poboljšava efikasnost i tačnost dijagnostičkih procedura, već i smanjuje rizik od kontaminacije i ljudske

greške. Fokus ovog rada biće na analizi principa PCR metodologije, koracima pripreme uzoraka, kao i prednostima koje automatizovani sistemi donose u svakodnevnoj praksi.

Cilj istraživanja jeste doprineti boljem razumevanju i primeni savremenih tehnologija u dijagnostici HCV-a.

2. AUTOMATIZOVANI PCR SISTEMI

Automatizovani PCR sistemi predstavljaju ključnu tehnologiju u modernim kliničkim laboratorijama, omogućavajući brzu i preciznu analizu uzoraka. Ovi sistemi, opremljeni naprednim funkcijama kao što su robotska priprema uzoraka i praćenje amplifikacije u realnom vremenu, značajno poboljšavaju efikasnost dijagnostičkih procedura. U kontekstu detekcije HCV-a, automatizovani PCR sistemi omogućavaju brzo i tačno kvantitativno određivanje nivoa HCV RNA, što je od suštinskog značaja za praćenje terapijskog odgovora kod pacijenata [3].

Integracija ovih sistema u kliničke laboratorije ne samo da poboljšava kvalitet rezultata, već i smanjuje rizik od kontaminacije i ljudskih grešaka. Očekuje se da će kontinuirani tehnološki napredak učiniti ove sisteme još efikasnijim alatima u savremenoj medicinskoj praksi, doprinoseći boljim terapijskim ishodima i efikasnijem upravljanju infekcijama.

U daljem radu, posebno ću se fokusirati na korišćenje kombinovanog automatizovanog sistema za pripremu, izolaciju i analizu PCR-a.

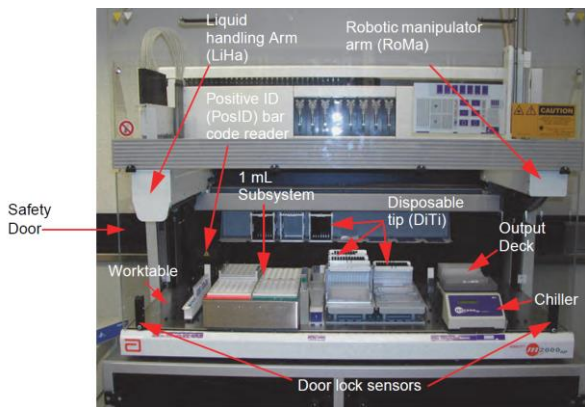
2.1. Deo za pripremu i izolaciju uzorka

Operator kontroliše automatizovani sistem putem SCC-a (*eng. System Control Center, SCC*), koristeći softver. Na kraju procedure ekstrakcije uzoraka, korisnik može izabrati protokol za dodavanje Master Mix-a koji automatski distribuira reagens i ekstraktovane nukleinske kiseline u 96-Well Optical ploču, koja se zatim koristi na instrumentu za detekciju nukleinskih kiselina.

Automatizovani sistem razvijen je u više modela, pri čemu svaki model predstavlja unapređenje sistema, što je rezultat kontinuiranog napretka tehnologije.

NAPOMENA:

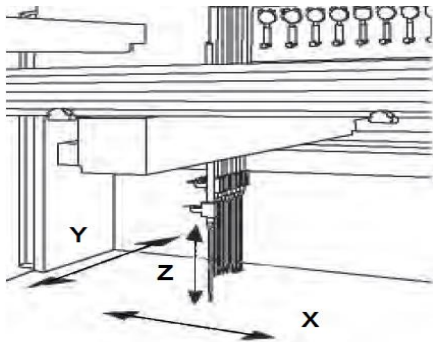
Ovaj rad proistekao je iz master rada čiji mentor je bila prof. dr Dragana Bajić.



Slika 1. Izolator nukleinskih kiselina [4]

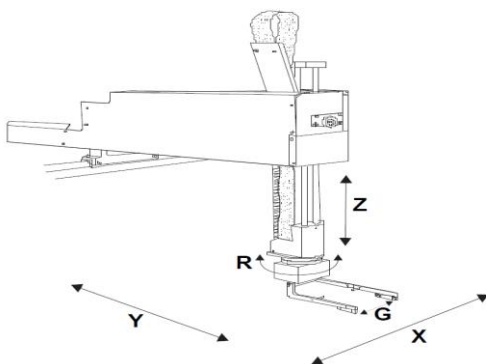
Unutrašnjost izolatora nukleinskih kiselina se sastoji od:

1. Liquid handling arm (LiHa) je odgovoran za pipetiranje, razređivanje i mešanje uzoraka i reagensa. Opremljen je sa do osam kanala za precizno aspiriranje i doziranje tečnosti, kretanjem u tri pravca (X, Y i Z) radi efikasnog obavljanja zadataka.



Slika 2. LiHa u tri pravca [4]

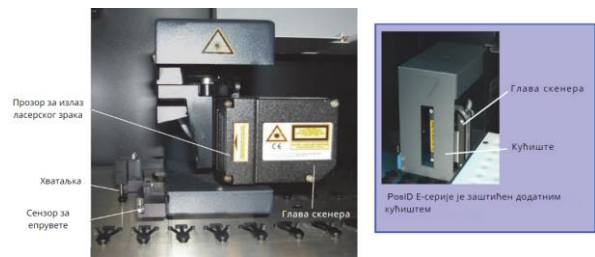
2. Robotic manipulator arm (RoMa) omogućava fleksibilno i precizno rukovanje nosačima za jednokratne nastavke i nosačima za 1 mL podsistem. RoMa se kreće u pet pravaca, uključujući rotaciju i horizontalno pomeranje, što omogućava precizno postavljanje i premeštanje uzoraka.



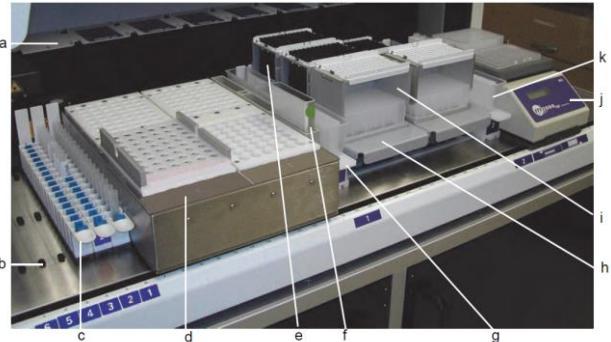
Slika 3. Pet pravaca kretanja RoMa [4]

3. Positive ID (PosID) barcode reader - bar-kod čitač, slika 4. identifikuje i verifikuje identitet uzoraka, nosača i reagensa pomoću skenera, čime osigurava tačnost u pripremi i analizi uzoraka.

4. Worktable je konfigurisan za obradu 96 uzoraka, sa različitim komponentama uključujući stalke za nastavke, nosače za reagense, i stanicu za otpad, slika 5.



Slika 4. PosID čitač bar-kodova [4]

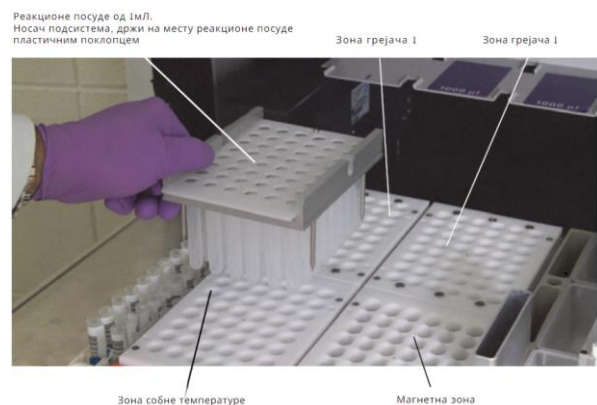


Slika 5. Raspored radnog stola [4]

Tabela 1. Nazivi delova na radnom stolu a-k [4]

a. Stalac za nastavke od 1000 μ L	g. Rek posuda za reagense
b. Pozicioni pinovi (vodilice)	h. Nosači za DiTi rekovе
c. Rek za uzorke	i. Stalac za ponovo korišćenje nastavaka
d. Podsistem od 1mL	j. Postolje sa ležištima
e. Stalac za nastavke	k. Rek posuda za reagense od 200 mL
f. Stanica za otpad	

5. 1ml Subsystem obuhvata četiri zone (grejač 1, grejač 2, zona sobne temperature i magnetna zona) za pipetiranje, inkubaciju i magnetno hvatanje uzoraka. Ovaj sistem omogućava obradu do 96 uzoraka istovremeno.



Slika 6. Sistem optimalnih temperatura [4]

6. Disposable tip (DiTi) koristi se za skladištenje i zamenu nastavaka za pipete, sa sedam pozicija za potpuno napunjene nosače, uz metalni držač za ponovno korišćenje.



Slika 7. DiTi police numerisane brojevima [4]

7. Output deck je postolje na kojem se nalaze ležišta za deep well ploče, PCR ploče, amplifikacione reagense, master mix i izolator. Omogućava organizovanu i efikasnu pripremu i rukovanje svim potrebnim materijalima za PCR analize.



Slika 8. Postolje sa ležištima, odozgo [4]

8. Chiler je komponenta koja obezbeđuje hlađenje i očuvanje uzoraka i reagensa na odgovarajućim temperaturama tokom procesa analize, osiguravajući stabilnost i tačnost rezultata.

2.2. Deo za PCR reakciju

Deo za PCR reakciju predstavlja vrhunski alat za kvantitativnu i kvalitativnu detekciju nukleinskih kiselina putem real-time PCR tehnologije. Ovaj sofisticirani sistem omogućava precizno merenje amplifikacije u realnom vremenu, čime značajno poboljšava tačnost i brzinu dijagnostičkih procesa.

Glavne komponente sistema uključuju tunsten-halogen lampu, CCD kameru, optičke filtere i Peltier sklopove za kontrolu temperature, što omogućava visoku preciznost u detekciji fluorescencije. Sistem koristi pet parova ekcitacionih i emisijskih filtera za simultano praćenje do pet fluorescentnih signala.

Sa mogućnošću analize više uzoraka u isto vreme, deo za PCR reakciju smanjuje rizik od kontaminacije i skraćuje vreme do dobijanja rezultata.

Kontrola sistema se obavlja putem softverskog sistema koji omogućava upravljanje parametrima analize i očitavanje rezultata, pružajući visoku tačnost i efikasnost u kliničkim i istraživačkim laboratorijama.



Slika 9. Prednja i zadnja strana dela za PCR reakciju [5]

Tabela 2. Karakteristike prednjeg dela za PCR reakciju

Улазна врата	Omogućava pristup: -halogenoj lampi -termalnom bloku -zagrejnem poklopcu
Прекидач	Uključenje i isključenje instrumenta
Фиока за PCR плочу	Ležište za postavljanje ili uklanjanje PCR ploče

Tabela 3. Karakteristike zadnjeg dela za PCR reakciju

Вентилаторски отвори	Otvori za tri ventilatora koji hlade instrument
USB portovi	Omogućava povezivanje sa računаром
Осигурачи	Dva naizmenična strujna (AC) sporo pregorevajuća osigurača (12,5A, 250V) koja mogu prekinuti tok električne struje kada dođe do preopterećenja
Кабл за напајање	Povezivanje kabla za napajanje

Prednja i zadnja strana dela za PCR reakciju, prikazane na slici 9, ilustruju ključne komponente i operative delove sistema. Tabela 2 i 3 dodatno objašnjavaju funkcionalnost svakog dela, omogućavajući bolju razumljivost i efikasnije korišćenje ovog sofisticiranog alata u molekularnoj biologiji.

3. MATERIJALI I METODE

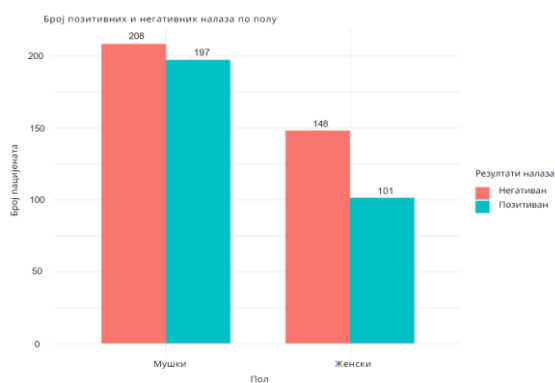
Za analizu uzoraka krvi koristimo epruvete sa antikoagulansom EDTA. Nakon što uzorci stignu u laboratoriju, centrifugiraju se na 3000 obrtaja u minuti tokom 10 minuta kako bi se odvojila plazma. Plazma se potom raspodeljuje u eppendorf epruvete i čuva na -18°C do trenutka obrade. Na dan analize, uzorci se odmrzavaju i označavaju rednim brojevima. Prve tri pozicije u reku su rezervisane za kontrole: negativnu, slabo pozitivnu i jako pozitivnu, dok se ostatak koristi za uzorke. Kada se otvara nova kutija sa reagensima, vrši se kalibracija. Četiri pozicije rezervisane su za kalibrator A, četiri za kalibrator B, potom tri za kontrole i preostale pozicije se koriste za uzorke. Ovaj postupak osigurava tačnost i preciznost analize pre nego što se pristupi obradi uzoraka.

Izolacija uzoraka se obavlja na Abbott m2000sp izolatoru, koji koristi dva protokola: Protokol I za manualnu pripremu i Protokol II za automatsku pripremu i detekciju. Mi koristimo Protokol II zbog njegove veće automatizacije, brzine obrade i smanjenog rizika od

kontaminacije, što značajno doprinosi tačnosti i pouzdanosti rezultata. Abbott m2000sp kombinuje Abbott RealTime HCV test komponente koje ulaze u reakciju amplifikacije (HCV oligonukleotidne reagense, termostabilne rTth polimerazne enzime i aktivacioni reagens). Abbott m2000sp vrši raspoređivanje pripremljenog master miksa u Abbott 96-Well Optical Reaction ploče, zajedno sa alikvotama nukleinskih kiselina različitih uzoraka, pripremljenih u Abbott m2000sp. Ploča je pripremljena za prenos u Abbott m2000rt, nakon manuelne aplikacije optičke nalepnice. U Abbott m2000rt, ciljna RNA se konvertuje u cDNA reverznom transkripcijom uz pomoć termostabilne rTth DNK polimeraze. Tokom reakcije, amplifikacija ciljnih sekvenci (HCV i IC) se odvija istovremeno, što omogućava precizno i pouzdano detektovanje prisustva HCV u uzorku.

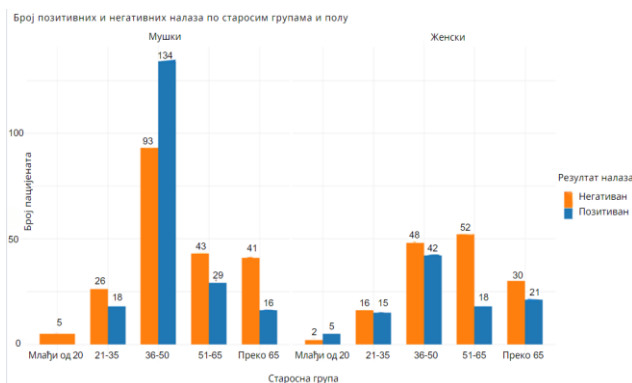
4. REZULTATI

U ispitivanju je korišćeno 654 uzorka plazme od pacijenata iz Univerzitetskog Kliničkog Centra Vojvodine, od kojih je 405 muškaraca i 249 žena, kako bi se testirali na hepatitis C virus. Rezultati su pokazali da je procenat pozitivnih testova nešto veći kod muškaraca (48,6%) u odnosu na žene (40,6%), što je prikazano na slici 10. Statistička obrada podataka izvršena je korišćenjem R programa, što je omogućilo detaljnu analizu i tačno predstavljanje rezultata.



Slika 10. Raspodela nalaza po polu

Distribuciju pozitivnih i negativnih nalaza po starosnim grupama i polu je prikazana na slici 11.



Slika 11. Nalazi različitih starosnih grupa i pola

Prikazano je pet starosnih grupa: mlađi od 20 godina, 21-35, 36-50, 51-65 i preko 65 godina. Ova slika pokazuje da je najveća učestalost pozitivnih nalaza u starosnoj grupi od

36-50 godina i kod muškaraca i žena, gde je zabeleženo 134 i 42 pozitivnih nalaza.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu istraživanja, jasno je da automatski PCR sistemi, kao što je Abbott m2000, predstavljaju značajan korak napred u dijagnostici hepatitisa C virusa u odnosu na manuelne aparate. Automatski sistemi nude bržu i precizniju obradu uzoraka, što je ključno za pravovremenu i tačnu dijagnozu. U analizi uzoraka plazme od 654 pacijenata, procenat pozitivnih testova na HCV virus bio je veći kod muškaraca (48,6%) nego kod žena (40,6%), što ukazuje na potrebu za pouzdanim i efikasnim dijagnostičkim alatima.

Automatizovani sistemi su superiorni manuelnim aparatima jer značajno smanjuju mogućnost ljudskih grešaka i rizik od kontaminacije. Pružaju doslednost i preciznost u svakom koraku procesa, od pripreme uzoraka do analize rezultata. Automatizacija omogućava obradu većeg broja uzoraka u kraćem vremenskom periodu, što je posebno važno u velikim skринing programima i hitnim situacijama. Uz to, automatski sistemi poboljšavaju tačnost kvantitativnog određivanja HCV RNK, što je ključno za praćenje terapijskog odgovora.

Ove prednosti doprinose povećanju produktivnosti i efikasnosti laboratorijskog rada, čineći automatizovane PCR sisteme nezamenjivim u savremenoj medicinskoj praksi i omogućavajući brže, preciznije i pouzdanije dijagnostičke procese.

6. LITERATURA

- [1] Tait, J. M., H. Wang, B. P. Stephens, M. Miller, P. G. McIntyre, S. Cleary, и J. F. Dillon. „Multidisciplinary Managed Care Networks—Life-saving Interventions for Hepatitis C Patients“. *Journal of Viral Hepatitis* 24, изд. 3 (Март 2017.): 207–15. <https://doi.org/10.1111/jvh.12633>.
- [2] Narayanamurthy, Vigneswaran, Z. E. Jeroish, K. S. Bhuvaneshwari, и Fahmi Samsuri. „Hepatitis C Virus (HCV) Diagnosis via Microfluidics“. *Analytical Methods* 13, изд. 6 (2021.): 740–63. <https://doi.org/10.1039/D0AY02045A>.
- [3] Clarke, Berwyn. „Molecular virology of hepatitis C virus“, bez datuma. DOI: [10.1099/0022-1317-78-10-2397](https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-10-2397)
- [4] Abbott, Molecular Inc. *M2000sp Operations Manual*. 200681–107. Des Plaines, IL: Abbott Molecular Inc., 2013.
- [5] Abbott, Molecular Inc. *M2000rt Operations Manual*. 200680–106. Des Plaines, IL: Abbott Molecular Inc., 2012.

Kratka biografija:



Kasandra Galic rođena je u Kikindi 1994. god. Završila sam srednju medicinsku školu “Miloš Crnjanski” u Kikindi 2013.god. Student je master akademskih studija programa Biomedicinsko inženjerstvo na Fakultetu tehničkih nauka u Novom Sadu. kontakt: kasandra.galic@gmail.com