

**ČESKÉ VYSOKÉ  
UČENÍ TECHNICKÉ  
V PRAZE**

**FAKULTA  
BIOMEDICÍNSKÉHO  
INŽENÝRSTVÍ**



**BAKALÁŘSKÁ  
PRÁCE**

**2018**

**NIKOL  
POLÁČKOVÁ**



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**

---

Fakulta biomedicínského inženýrství  
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

**Současné trendy v diagnostice viru HIV**

**Current Trends in the HIV Diagnosis**

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: MUDr. Daniela Obitková

**Nikol Poláčková**

---

**Kladno, květen 2018**

## Z a d á n í   b a k a l á ř s k é   p r á c e

Student:           **Nikol Poláčková**  
Obor:                Zdravotní laborant  
Téma:               **Současné trendy v diagnostice viru HIV**  
Téma anglicky:    Current Trends in the HIV Diagnosis

### Z á s a d y   p r o   v y p r a c o v á n í :

Problematika infekce virem HIV a syndrom získané imunodeficiency AIDS představuje aktuální téma v celosvětovém měřítku.

Předmětem bakalářské práce bude podat ucelený přehled moderních diagnostických postupů k průkazu infekce virem HIV v biologických materiálech, jejich principy a využití v klinické praxi.

Teoretická část bude zaměřena na metabolismus viru HIV, jeho interakci s hostitelskou buňkou, způsob replikace, syntézy vlastních proteinů a terapeutické možnosti infekce.

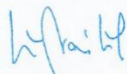
Praktická část bude soustředěna na principy přímých i nepřímých postupů v diagnostice virového agens. Jedná se zejména o stanovení virového antigenu, protilátek proti HIV a stanovení antigenu p-24. Zahrnuty budou i metody PCR.

### Seznam odborné literatury:

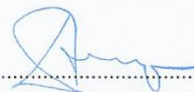
- [1] JILICH, David a Veronika KULÍŘOVÁ a kol. , HIV infekce - Současné trendy v diagnostice, léčbě a ošetřovatelství, ed. 1., Praha: Mladá fronta, 2014, ISBN 978-80-204-3325-1
- [2] ALBERTS, Bruce, Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky, ed. 2., Ústí nad Labem: Espero, 2006, ISBN 80-902906-2-0
- [3] ŠEJDA, Jan a kol. , Prevence, léčba a další aspekty nákazy HIV/ AIDS, ed. 1., Praha: Galén, 1993, ISBN 80-85824-02-7

Zadání platné do:   13.09.2019

Vedoucí:            MUDr. Daniela Obitková



.....  
vedoucí katedry / pracoviště



.....  
děkan

V Kladně dne 25.10.2017

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Současné trendy v diagnostice viru HIV vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Kladně dne 18.05.2018

.....  
podpis

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat své vedoucí práce paní MUDr. Daniele Obitkové za odborné vedení, cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích mé bakalářské práce. Rovněž bych chtěla poděkovat vedoucímu Národní referenční laboratoře pro HIV/AIDS panu RNDr. Vratislavu Němečkovi, CSc. za rady a čas, který mi věnoval při řešení dané problematiky.

## **Abstrakt**

Bakalářská práce se zaměřuje na vyšetřování infekce virem HIV s důrazem na nejmodernější postupy. Teoretická část se zabývá původem HIV viru, jeho cestami přenosu, interakcí HIV viru s infikovanou osobou a jejím imunitním systémem a možnou terapií.

Praktická část práce popisuje současný stav testování HIV viru v České republice. V kapitole metodika jsou systematicky uvedené metody přímé i nepřímé diagnostiky, které se využívají jak pro základní, tak i pro konfirmační testování v Národní referenční laboratoři pro HIV/AIDS. Jednotlivé metody, tedy EIA, western blot, imunoblot a PCR testování.

Výsledkem bakalářské práce je souhrn moderních metod testování vzorků na přítomnost HIV viru a grafy vystihující epidemiologickou situaci v České republice a také porovnání České republiky s ostatními státy Evropy.

## **Klíčová slova**

HIV; diagnostika HIV; EIA; Western blot; antigen p24; AIDS.

## **Abstract**

The bachelor thesis focuses on the examination of the HIV infection concentrating on the latest procedures. The theoretical part deals with the HIV virus origin and the way of its transmission, the interaction of the HIV virus with the immune system of the infected person and the possible therapy.

The practical part describes the current state of the HIV virus testing in the Czech Republic. In the Methodology chapter there are systematically given direct and indirect diagnostics methods, which are used for both the basic and the confirmation testing at the National HIV / AIDS Reference Laboratory. Individual methods, namely EIA, western blot, immunoblot and PCR testing.

The result of the bachelor thesis is a summary of modern methods of the HIV virus presence testing and graphs describing the epidemiological situation in the Czech Republic including the comparison of the Czech Republic with other European countries.

## **Keywords**

HIV; HIV diagnosis; EIA; Western blot; p24 antigen; AIDS.

# Obsah

1	Úvod .....	11
2	Současný stav .....	12
2.1	Původ a druhy viru HIV .....	13
2.2	Morfologie viru .....	14
2.3	Cesty přenosu HIV .....	15
2.4	HIV a hostitel .....	16
2.4.1	Vstup HIV do cílové buňky hostitele .....	17
2.4.2	Penetrace HIV do hostitelské buňky .....	19
2.4.3	Replikačního cyklus HIV uvnitř hostitelské buňky .....	20
2.4.4	Exprese virových genů .....	22
2.5	HIV a imunitní systém .....	23
2.5.1	Antigen prezentující buňky .....	23
2.5.2	Interakce DC a B/T-lymfocytů .....	24
2.5.3	Lymfatická tkáň .....	25
2.5.4	HLA systém .....	27
2.5.5	T-lymfocyty a NK buňky .....	28
2.5.6	HIV-specifická buněčná odpověď .....	28
2.5.7	Imunitní odpověď TH <sub>1</sub> /TH <sub>2</sub> .....	30
2.5.8	HIV-specifická humorální imunitní odpověď .....	30
2.6	Terapie .....	32
2.6.1	Podávání léků .....	34
2.6.2	Inhibitory enzymu reverzní transkriptázy .....	34
2.6.3	Inhibitory vstupu .....	36



2.6.4	Inhibitory proteázy .....	37
2.6.5	Inhibitory integrázy .....	38
2.6.6	Inhibitory fúze .....	38
2.6.7	Indikace k zahájení léčby .....	39
2.7	Diagnostika HIV .....	41
2.7.1	Organizace laboratorního vyšetření HIV/AIDS V ČR .....	41
2.7.2	Laboratorní vyšetřování HIV .....	42
2.7.3	Kategorie laboratorního vyšetření HIV .....	43
2.7.4	Rychlé testy .....	45
3	Cíl práce.....	46
4	Metodika .....	47
4.1	Přijetí a postup confirmace reaktivního vzorku v NRL pro HIV/AIDS..	47
4.2	Enzymová imunoanalýza (EIA).....	48
4.2.1	Popis metody .....	48
4.2.2	Pracovní postup.....	49
4.2.3	Validace a interpretace výsledků .....	50
4.3	Western blot.....	50
4.3.1	Popis metody .....	50
4.3.2	Princip metody western blot .....	51
4.3.3	Validace a interpretace výsledků .....	51
4.4	Imunochromatografie .....	53
4.4.1	Popis metody .....	53
4.4.2	Pracovní postup.....	54
4.4.3	Validace a interpretace výsledků .....	55
4.5	Enzymová fluorescenční imunoanalýza (ELFA).....	56

4.5.1	Popis metody .....	56
4.5.2	Pracovní postup.....	57
4.5.3	Interpretace výsledků .....	59
4.6	HIV RNA PCR.....	59
4.6.1	Popis metody .....	59
4.6.2	Pracovní postup.....	59
4.6.3	Interpretace výsledků .....	60
5	Výsledky.....	62
5.1	Výhody a nevýhody jednotlivých metod.....	62
5.1.1	EIA.....	62
5.1.2	Western blot .....	62
5.1.3	Imunochromatografické metody .....	63
5.1.4	ELFA.....	63
5.1.5	HIV RNA PCR.....	64
5.2	Epidemiologická situace .....	64
5.2.1	Počty vyšetření a počty HIV+ osob v České republice .....	64
5.2.2	ČR v porovnání se světem .....	65
5.2.3	Testování krevních vzorků.....	66
5.2.4	Nové případy AIDS .....	66
6	Diskuze.....	68
7	Závěr .....	76
8	Seznam použitých zkratk.....	77
9	Seznam použité literatury.....	80
10	Seznam použitých obrázků .....	89
11	Seznam použitých tabulek.....	90

# 1 ÚVOD

HIV virus je stále celosvětovým problémem. I přes rozsáhlé snahy epidemii HIV viru podchytit, bylo ke konci roku 2016 předpokládáno 36,7 milionů lidí žijící s HIV, z toho 1,8 milionů osob přibylo právě za rok 2016. Česká republika se řadí mezi státy s nižším výskytem HIV infekce, i přes tyto pozitivní zprávy neustále narůstá počet HIV pozitivních osob i u nás. K 31.12.2017 bylo v České republice diagnostikováno, od zahájení sledování infekce v roce 1.10.1985, 3 160 osob s pozitivním HIV statutem [1]; [2].

Česká republika disponuje dostatečně kvalitním diagnostickým zázemím se stále se zvyšující citlivostí a specifitostí metod využívaných k přímé i nepřímé diagnostice HIV viru. Neustále je snaha zavádět nové metody, jako je například NAT-PCR testování v transfuzní službě, které zvyšují úroveň testování. I přes citlivější moderní metody je stále velkým problémem v diagnostice HIV tzv. diagnostické okno. Každý organizmus reaguje na vir jinak, a proto i nejmodernější metody nemusí být v odhalení viru vždycky stoprocentní.

Dalším problémem, sice již menší, je určitá tabuizace tématu HIV. I přes značné snahy HIV center a dalších organizací je HIV/AIDS strašákem, o kterém se nemluví. Značné procento osob žijících s HIV, svůj pozitivní status stále nezná. Problém se týká převážně osob ve zvýšeném riziku, které nelze přimět nechat se testovat. Každý, kdo si je vědom rizikového chování má možnost se nechat ať už pod jménem nebo anonymně vyšetřit. S tímto problémem by mohly pomoci rychlé testy certifikované pro domácí použití, které sebou ovšem nesou mnohá rizika.

Ve své práci usiluji o zachycení aktuálního stavu problematiky HIV tak, jak tomu odpovídá úroveň v letech 2017/2018. Čtenář si ale musí být vědom skutečnosti, že onemocnění virem HIV podléhá překotnému vývoji a poznatky o této problematice se stále mění a narůstají [3].

## 2 SOUČASNÝ STAV

HIV virus (virus lidského imunodeficitu) je řazen do skupiny RNA virů, konkrétně do čeledi Retroviridae. Tento název je odvozen od enzymu reverzní transkriptázy, který je charakteristický pro všechny zástupce této čeledi. Všichni zástupci obsahují dvě kopie jednořetězcové RNA, kterou jsou schopny přepisovat do podoby provirové DNA právě pomocí enzymu reverzní transkriptázy. Později byl HIV virus zařazen do podčeledi Orthoretrovirinae a rodu Lentivirus. Již samotný název rodu Lentivirus (lat. Lentus, pomalý) reflektuje schopnost některých zástupců rodu vyvolávat pozvolna se rozvíjející infekce s postupně se zhoršujícím průběhem a fatálním koncem [4]; [5].

Právě RNA virus HIV je původcem onemocnění AIDS (syndrom získané imunitní nedostatečnosti), který způsobuje deficit v imunitním systému organismu a tím omezuje jeho funkci. První zprávy o této nemoci se datují k roku 1981, kdy bylo toto onemocnění diagnostikováno u mladých homosexuálních mužů, kteří byli před nákazou relativně zdraví. Díky těmto faktům byla vyslovena hypotéza, že se jedná o sexuálně přenosné onemocnění, tato hypotéza se následně, po pátrání po dalších nemocných ze stejné komunity potvrdila [6].

Hned od počátku výskytu onemocnění AIDS začala řada výzkumných týmů po celém světě pátrat po předpokládaném původci syndromu. V letech 1983–1984 dva výzkumné týmy (laboratoř prof. L. Montagniera v Pasteurově Institutu v Paříži a prof. R. Gallo v Národním zdravotním ústavu v americké Bethesdě) nezávisle na sobě objevily etiologické agens AIDS (ve Francii pod názvem LAV, v Americe pod HTLV III), které bylo později označeno novým jednotným názvem HIV. V roce 1986 v laboratoři prof. L. Montagniera byl popsán další virus izolovaný z pacienta vykazující onemocnění AIDS, který nesl jisté odlišnosti od původního viru. Tento nově popsáný virus byl, díky své příbuznosti k HIV pojmenován jako virus HIV-2 [7]; [8].

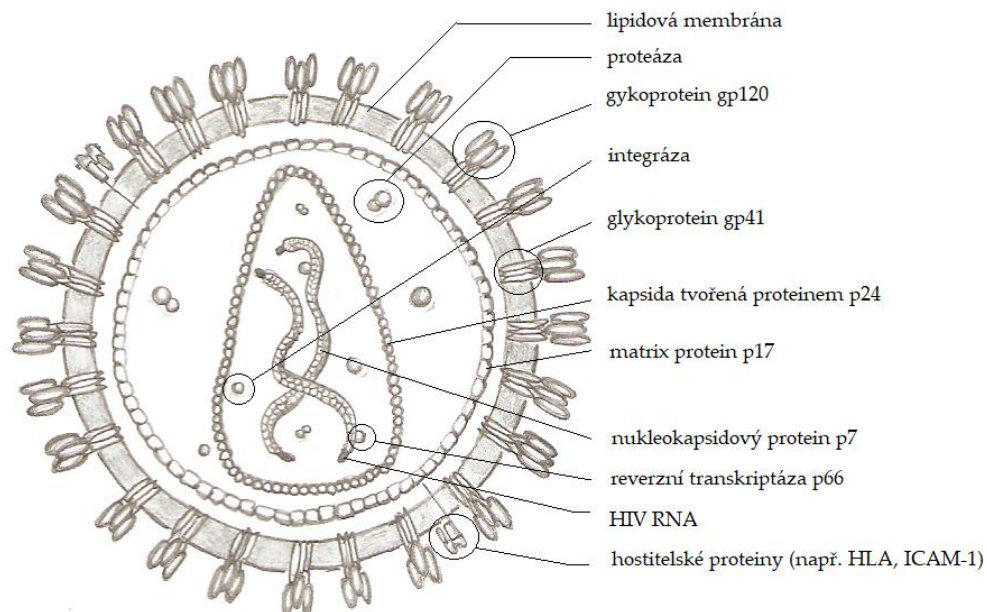
## 2.1 Původ a druhy viru HIV

Na základě fylogenetické příbuznosti mezi HIV virem a opičími retroviry SIV (virus opičí imunitní nedostatečnosti) se původ viru HIV předpokládá, právě z této větve RNA virů. SIV viry se přirozeně vyskytují u afrických primátů a není známo, že by u těchto zvířat vyvolávaly onemocnění. Byla identifikována celá řada divergentních typů SIV a dá se říci, že každý infikovaný druh primátů má svůj vlastní specifický SIV vir. HIV-1 vir se tedy pravděpodobně vyvinul z viru postihujícího šimpanze, tedy šimpanzího SIVcpz viru, který napadá šimpanze čego (*Pan troglodytes troglodytes*). Vir tedy s největší pravděpodobností přeskočil druhovou bariéru a dostal se z šimpanze, který byl jeho nositelem s dobrou tolerancí k němu, na člověka, který se stal novým hostitelem tohoto viru a nebyl na něj připraven. Samotný virus SIV je ale v lidském těle velmi slabý a lidský imunitní systém ho dokáže během několika týdnů zcela potlačit. Aby se tedy SIV virus vyvinul až do HIV, muselo pravděpodobně proběhnout několik přenosů mezi jedinci v rychlém sledu za sebou. K samotnému přeskocení druhové bariéry muselo dojít minimálně třikrát, co naznačuje vznik tří virových skupin, které byly doposud rozpoznány, a to vir HIV-1–M, N a O. Vir HIV-2 má také příbuznost se SIV viry, ovšem od HIV-1 má trochu odlišný původ a jeho nejbližším příbuzným je virus SIVsmm, jehož nositelem je mangabej kouřový (*Cercocebus atys atys*). K přenosu infekce HIV-1 i HIV-2 na člověka došlo pravděpodobně při zabíjení opic jako zdroje potravy domorodců [9]; [10]; [11]; [12]; [13].

HIV-1 a HIV-2, se od sebe liší již samotným genetickým kódem, což se ve výsledku projevuje například v jiném složení povrchových struktur. Oba typy se také odlišují geografickým výskytem, patogenitou, klinickým obrazem a některými epidemiologickými charakteristikami. V Evropě, na americkém a asijském kontinentu se vyskytuje převážně HIV-1, HIV-2 zůstává lokalizován zejména v oblastech západního pobřeží Afriky. Celá bakalářská práce je tedy soustředěna především na HIV-1 [14].

## 2.2 Morfologie viru

HIV-1 virionová částice má sférický tvar o průměru 100–110 nm a je tvořena dvěma hlavními částmi, a to vnějším obalem, který je formován lipoproteiny a virovou kapsidou tzv. nukleokapsidou. Na vnějším lipoproteinové membráně každé virové částice je obsaženo 72 glykoproteinových komplexů, které jsou do ní integrovány a jsou složeny z trimerů vnějšího glykoproteinu gp120 a transmembránového glykoproteinu gp41. Vazba mezi gp120 a gp41 je pouze volná, a proto může být gp120 spontánně uvolněn do prostředí (gp120 může být detekován v séru nebo v lymfatické tkáni infikovaných pacientů). Během procesu pučení může virus také začlenit na povrch své vnější membrány různé hostitelské proteiny pocházející z membrány hostitelské buňky, jako jsou například proteiny HLA třídy I a II nebo adhezní proteiny, jako je ICAM-1, které viru napomáhají k adhezi na cílovou buňku. Na vnější straně lipoproteinové membrány je navázán matrixový protein p17, který vystylá vnitřní povrch virového obalu a zprostředkovává pučení viru. P17 je k lipoproteinové vrstvě přichycen pomocí 14-C řetězce kyseliny myristové [15]; [8].



Obr. 1 - Struktura viru HIV-1 (Poláčková 2018).

Vlastní jádro (nukleokapsida) je kryto proteinovým obalem p24, který má tvar ikozahedronu (dvanáctistěnu). V kapsidě jsou uschovány nejdůležitější komponenty virionu. Dvě kopie HIV-1 RNA, které jsou součástí komplexu protein-nukleová kyseliny. Tento komplex je složen z nukleoproteinu p7 a reverzní transkriptázy p66 (RT). Virové částice obsahují veškeré enzymatické zařízení, které je nezbytné pro replikaci: reverzní transkriptázu (RT), integrazu p32 (I) a proteázu [4]; [7]; [16].

### 2.3 Cesty přenosu HIV

Virová agens se může nacházet v krvi, spermatu, preejakulátu a vaginálních sekretech infikovaných osob. Tyto tekutiny jsou hlavním prostředkem přenosu viru. I když se virus nachází i ve slinách, mateřském mléce, moči, zvratkách, stolici, slzách a potu, jeho množství je zde vysoce podprahové a k vyvolání infekce samo o sobě nestačí (organismus je schopen se bránit), přestože by tyto tekutiny teoreticky mohly být zdrojem infekce (v případě, že by se dostaly do styku s krví daného jedince), v praxi se na šíření viru podle odborníků nepodílejí. Větší potencionální riziko nákazy sebou nese mozkomíšní mok, výpotky nebo plodová voda [8]; [17].

Přenos může být tedy zprostředkován:

- pohlavním stykem s infikovanou osobou (heterosexuálním, homosexuálním):
  - vaginálním;
  - análním – vyšší riziko než u vaginálního přenosu, díky zranitelnější rektální sliznici;
  - orogenitálním;
- krví:
  - infikovanou krví a některými krevními deriváty;
  - sdílení jehel, stříkaček či roztoku drogy mezi i.v. narkomany;
  - krvavé poranění infikovanou jehlou či jiným předmětem (např. holíci břitvami, nesterilními tetovacími nástroji apod.);

- z infikované matky na plod nebo novorozence (vertikálně):
  - transplacentárně;
  - kojením;
- jiné cesty:
  - darováním orgánů či spermatu;
  - masivním zasažením sliznic či kožní oděrky infikovanou tělní tekutinou [7]; [15]; [17].

Virus HIV se nepřenáší vzduchem, kapénkami (kašláním, rýmou), líbáním, bodavým hmyzem, společným sdílením předmětů (nádobí, ložní prádlo apod.), vodou v bazénu, vířivce [17].

## 2.4 HIV a hostitel

Nejčastějším způsobem nákazy HIV infekcí je přenos pohlavním stykem. Při této cestě nákazy hrají hlavní roli antigen prezentující buňky, především pak Langerhansovy buňky (LC), které jsou přítomny ve slizničním epitelu a v epidermis. Při nákaze krevní cestou (tzn. přes krev a krevní deriváty, transplantace, vertikální přenos nebo kontaminovaným materiálem při i.v. aplikaci drog) jsou infikovány přímo samotné CD4 lymfocyty. CD4 lymfocyty jsou pomocné T-lymfocyty, které mají na své vnější straně cytoplazmatické membrány povrchových glykoproteinů CD4, který je především koreceptorem, jenž se váže na antigeny vystavované na komplexech MHC II. třídy. Následně se infekce šíří do lymfoidních tkání, kde se nachází folikulární dendritické buňky, které po nákaze slouží jako rezervoár infekce. V lymfoidní tkáni dochází k rozsáhlému zmnožení viru HIV, ten se poté uvolňuje z tkáně do krevního řečiště a organismus se potýká s rozsáhlou viremíí. Denní obrat v akutní fázi činí až 10<sup>10</sup> virů. Virus je rozváděn po celém těle a usídluje se v lymfatické tkáni orgánů obsahující CD4 lymfocyty. V určitých tkáních dochází k dalšímu pomnožení viru, v jiných, například v tkáních mozku nebo kostní dřeni se nacházejí tzv. klidové CD4 lymfocyty, které slouží jako rezervoár [8]; [18]; [19].



### 2.4.1 Vstup HIV do cílové buňky hostitele

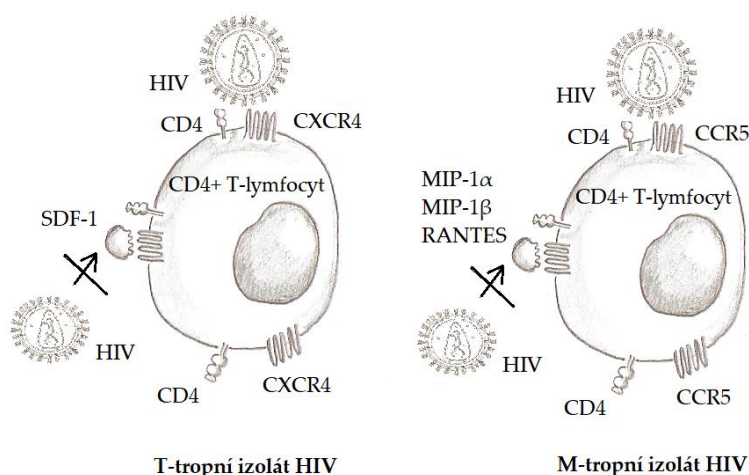
Poté co se virus HIV dostane do těla hostitele, je schopen se prostřednictvím ligandu a glykoproteinu o molekulové hmotnosti 120 kDa (gp120) vázat na CD4 receptor, který je exprimovaný na buněčné membráně cílových buněk. Cílovými buňkami pro virus HIV jsou především CD4 T-lymfocyty, makrofágy, folikulární dendritické buňky, mikroglie CNS a další. Interakce viru HIV s CD4 T-lymfocyty má za následek vznik imunodeficitního stavu, ostatní antigen prezentující buňky a mikroglie CNS slouží převážně k dlouhodobému uložení viru [8].

Vazba viru HIV prostřednictvím gp120 na receptor CD4 nejen že umožňuje následný vstup viru do cílové buňky, ale také narušuje intercelulární signální dráhy a dopomáhá k apoptóze CD4 T-lymfocytů. Bylo zjištěno, že při blokaci právě receptoru CD4 např. pomocí PRO542 (geneticky upravený tetravalentní fúzní protein), dochází k inhibici virové replikace in vitro [8]; [16].

Kromě vazby na CD4 receptor se virus váže pomocí C-C chemokinových koreceptorů CCR5 nebo CXCR4 (existují i duálně tropní kmeny HIV, tyto kmeny poté mohou využívat jak receptor CCR5, tak CXCR4 ke vstupu do cílové buňky). Jedná se o skupinu receptorů se sedmi transmembránovými regiony, které jsou intracelulárně spojeny s G-proteiny. Tyto receptory jsou přirozenými receptory pro chemokiny, jako jsou například MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  a Rantes. Tyto chemokiny, pokud jsou v dostatečném množství dokáží zamezit navázání viru HIV pomocí gp120, díky tomu že se na vazebná místa naváží samy. CCR5 a CXCR4 jsou povrchové struktury důležité právě pro fúzi a následný průnik HIV do cílové buňky a určují takzvaný „tropismus“ viru, tzn. které buňky daný virový kmen přednostně infikuje. Koreceptor CXCR4 je lokalizován převážně na naivních CD4 T-lymfocytech, tato povrchová struktura má především afinitu k T-tropním kmenům HIV. Tyto T-tropní kmeny indukují tvorbu syncytií a jsou spojovány s rychlejší progresí nemoci [16].

Koreceptor CCR5 je nezbytný pro monocytotropní (M-tropní) izoláty HIV. Tyto M-tropní izoláty jsou schopny atakovat makrofágy, monocyty a CD4 T-lymfocyty v časně fázi infekce. M-tropní izoláty neindukují tvorbu synticií, a mnohem lépe se ukrývají před imunitními mechanismy, snadněji přežívají v infikovaných organizmech, a proto jsou asociovány s dlouhodobou asymptomatickou fází [8]; [20].

Právě u koreceptoru CCR5 byla prokázána asociace mezi delecí genu kódujícího tento receptor CCR5-Δ32 a sníženým rizikem infekce virem HIV. Osoby s mutací nebo delecí tohoto genu mohou být k HIV méně vnímaví, dokonce i zcela rezistentní díky nepřítomnosti či nefunkčnosti koreceptoru CCR5. U homozygotů s delecí 32-bp (v populaci asi 1 % osob) nemůže dojít k onemocnění monocytotropními izoláty HIV, jedinci kteří jsou i přesto infikováni, jsou nakaženi variantami viru, které využívají CXCR4 pro vstup, tedy T-tropními kmeny HIV. U heterozygotů s touto genetickou indispozicí (cca 16 % naší populace) dochází obvykle k velmi pomalému nástupu onemocnění (asymptomatická fáze v průměru o 2 roky delší) a postižený jedinec mnohem lépe reaguje na léčbu, tyto jedince poté označujeme jako tzv. dlouhodobé nonprogresory (LTNP). Stále je v procesu zkoumání také vliv polymorfizmu promotorového genu CCR5 na progresi onemocnění [21].



Obr. 2 - Chemokiny a jejich receptory (upraveno dle [8]).

## 2.4.2 Penetrace HIV do hostitelské buňky

Po přilnutí viru na cílovou buňku prostřednictvím vazby gp120 na CD4 receptor a poté na receptory CCR5 a CXCR4, dojde k přiblížení virové částice k buňce hostitele. Následně se povrchový glykoprotein gp120 uvolní z transmembránového glykoproteinu gp41, který byl jeho nosičem. Udává se, že díky vazbě gp120 na CD4 dojde u gp41 ke konformačním změnám, tyto změny pak mají za následek, že gp41 dokáže vložit svůj hydrofobní N-terminální konec do membrány buňky hostitele [16].

Po přichycení gp41 k cílové buňce, dojde k tzv. zipování. Zazipování nastává mezi dvěma podjednotkami gp41 a po zazipování jednotlivých podjednotek do sebe, se membrána viru přiblíží velice blízko membráně hostitele a nastane jejich vzájemná fúze, následně je umožněn vstup viru do cílové buňky [16]; [22]; [23].

Zajímavým faktem je, že byl popsán a je ve stálém zkoumání alternativní vstup viru HIV do hostitelské buňky endocytózou. Je známo, že tento druh penetrace je povinným vstupním krokem pro obalené viry, jejichž fúzní proteiny jsou aktivovány až kyselým pH. U virů, které jsou nezávislé na pH, jako je právě HIV-1 se vědci domnívali, že k vniknutí viru do buňky dochází jen pomocí fúze membrán. Faktem je, že endocytózou se do buňky dostane mnohem více virových částic, ty poté vytvářejí v buňce endozomy. Za normálních podmínek se však buňka dokáže viru zbavit, vytvořením lysozymu a pomocí degradačních enzymů HIV virus rozloží. Problém však nastává, pokud změníme pH různými látkami (např. některé léky amantadin, chloroquin) a nemůže dojít k okyselení endozomů a lysozymů. V takovýchto případech se nemá cílová buňka, jak bránit, a dokonce může dojít až k mnohonásobnému navýšení infekčnosti viru [22]; [23].

### 2.4.3 Replikačního cyklus HIV uvnitř hostitelské buňky

#### 2.4.3.1 Obnažení genomu

Po průniku viru HIV do napadené buňky dochází k oddělení glykoproteinových obalů a do cytoplazmy poté putuje pouze nukleokapsida, která kromě řady proteinů (např. p24) obsahuje dva řetězce RNA a různé virové enzymy, jako je například reverzní transkriptáza (RT), integrázy, virová proteáza [20].

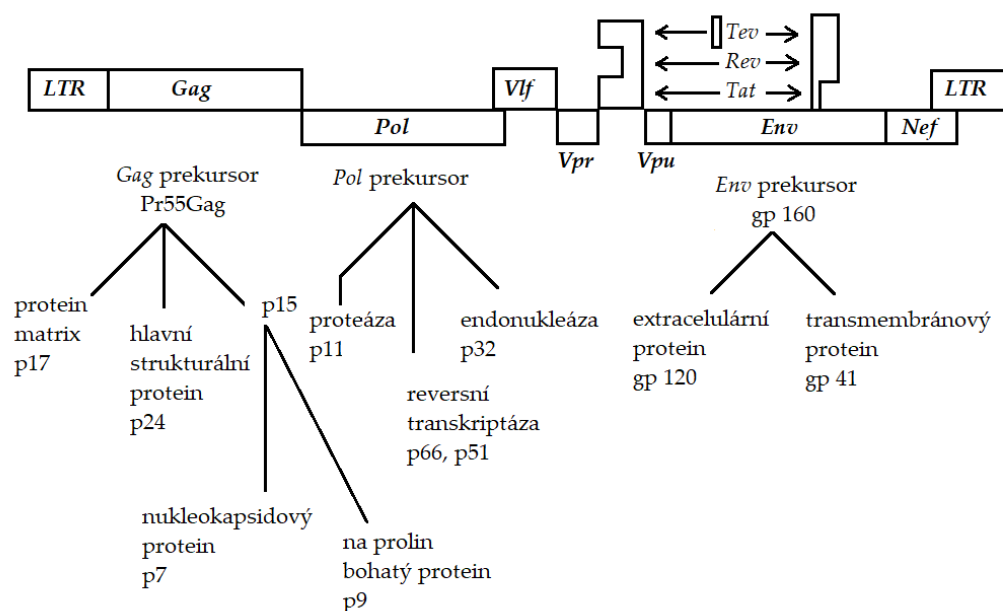
#### 2.4.3.2 Genom HIV-1

Virová RNA HIV je tvořena přibližně 9 200 nukleotidy. Tyto nukleotidy formují 9 genů. Tři strukturální geny se podílejí na stavbě základních součástí viru HIV, řadíme zde gen env (envelope), gag (group antigen) a pol (polymeráza). Gen env je především nositelem informace pro tvorbu virového obalu, tedy pro prekurzorový glykoprotein gp160, který podléhá proteolytickému štěpení za vzniku povrchového glykoproteinu gp120 a transmembránového glykoproteinu gp41. Gen gag obsahuje genetickou informaci pro tvorbu různých proteinů, např. proteinů matrix (p17), nukleokapsid (p7) nebo proteinů, které jsou součástí kapsidy viru (p24). Poslední strukturální gen pol zodpovídá za syntézu enzymů, které umožňují přepis virové informace, její duplikaci a integraci do genomu napadené buňky. Dále se v retrovirovém genomu na obou koncích nachází opakující se úseky nukleotidů, které se označují jako LTR (long terminal repeat). Tyto úseky neslouží k syntéze žádných struktur viru, ale mají za úkol zahájit specifickou činnost všech hlavních i regulačních genů [7]; [8]; [15].

Zbytek genomu je tvořen regulačními geny, jedná se například o gen tat (transactivator), který umožňuje přepis všech virových proteinů, gen rev (regulator of expression of virion proteins), jehož produkt působí na úrovni messenger RNA a jejím prostřednictvím může pozitivně i negativně ovlivnit tvorbu virových proteinů a v neposlední řadě gen nef (negative factor), který obsahuje informaci pro tzv. protein F jehož úkolem je negativní zpětná vazba. Pokud v genomu chybí gen

nef, tudíž také protein F, dochází k rychlejší replikaci viru. Dalšími regulačními geny pak jsou například gen vif (virion infectivity factory), vpr nebo vpu [7]; [15].

Genom HIV pak má strukturu 5' LTR-gag-pol-env-LTR 3' a je včleněn do DNA napadené buňky, čímž se stane navždy její součástí [8].



Obr. 3 - Genom HIV-1 (Poláčková 2018).

### 2.4.3.3 Replikace virového genomu

Po fúzi virové HIV částice s hostitelskou buňkou, jejím následným „odpláštěním“ a vniknutím nukleokapsidy nastane samotná replikace. Z nukleokapsidy se do cytoplasmu uvolní virová RNA s navázanou reverzní transkriptázou (RT). V cytoplasmě buněk poté dochází působením reverzní transkriptázy k transkripci genetické informace viru uložené v RNA na provirovou DNA. Tento přepis se uskutečňuje v několika krocích a výsledkem je dvouřetězcová HIV DNA s LTR úseky na obou koncích. Tato provirová HIV DNA se může v hostitelské buňce, která je v klidovém stádiu pouze akumulovat v podobě neintegrováné provirové HIV DNA. Tento vztah je nazýván latentní infekce buňky. Virogení buňka nadále normálně metabolizuje, plní své funkce a dělí se.

Představuje však rezervoáry HIV a je velkou komplikací při antiretrovirové terapii, která právě díky těmto buňkám s latentním rezervoárem nedokáže virus HIV zcela vymýtit. Pokud je ovšem buňka aktivovaná nebo dojde k její aktivaci, nastane pomocí integrázy začlenění provirové HIV DNA do genomu napadené aktivované buňky. K aktivaci buňky může dojít například v průběhu oportunní infekce, po očkování, při kontaktu s antigenem nebo přímo stykem virového glykoproteinu gp120 s napadenou buňku [7]; [8].

Po začlenění provirové HIV DNA do genomu buňky dochází k další transkripci, kdy se přepisuje integrovaná virová DNA, standardními buněčnými mechanismy do podoby mRNA, a je následně z jádra transportována do endoplasmatického retikula. V endoplasmatickém retikulu dochází k translaci virových proteinů, a nastává chronická infekce buňky, kdy buňka vytváří jednotlivé strukturální jednotky nových virionů, ale sama přežívá, metabolizuje a částečně plní své funkce. Může však dojít k akutní formě infekce, kdy provirus HIV zcela ovládne buněčný metabolismus ve svůj prospěch, a buněčné ribozomy začnou tvořit pouze komponenty pro nové viriony HIV. Její vlastní metabolismus je zcela utlumen, růst i množení je zastaveno, veškerá energie je vyčerpána a buňka se rozpadá a zaniká [7]; [8].

Samotná replikace virového genomu je zatížena velkým množstvím chyb. Předpokládá se, že reverzní transkriptáza má za následek v jednom replikačním cyklu vznik 1-10 chyb na virový genom. Důsledkem takto vzniklé mutace může být na straně jedné snížená infekčnost nebo virulence samotného viru HIV, na straně druhé pak může představovat samotnou evoluční výhodu viru, před selekční léčbou [8]; [3].

#### **2.4.4 Exprese virových genů**

Pokud dojde k chronické nebo akutní infekci, začne buňka v endoplasmatickém retikulu syntetizovat polypeptidy – stavební součásti nových

virových částic. Tyto jednotlivé polypeptidové komponenty jsou pak v cytoplazmě zkompletovány. Aby mohlo dojít k samotnému zkompletování musí být peptidické vazby, přítomné v řetězci gag-pol-env rozštěpeny pomocí enzymů HIV proteázy. Následně pak může dojít k samotnému vytvoření nových zralých virových partikulí a jejich maturaci v průběhu pučení z hostitelské buňky. Nové virové částice jsou ihned po dozrání infekční a mohou napadnout další dosud neinfikované cílové buňky [15]; [3].

Při samotném pučení sebou berou virové partikule i lipoidní substance buněčné membrány hostitelské buňky, pro svůj vlastní obal, ale také k maskování před imunitním systémem napadeného jedince. Maskují se například pomocí HLA znaků hostitelské buňky, které jsou na buněčné membráně přítomny [15].

## **2.5 HIV a imunitní systém**

### **2.5.1 Antigen prezentující buňky**

Hlavními buňkami imunitního systému prezentující antigen jsou B-lymfocyty, makrofágy a dendritické buňky (DC). Právě DC jsou neúčinnějšími induktory specifických imunitních odpovědí a jsou považovány za nezbytné pro iniciaci primárních antigen-specifických imunitních reakcí. Nezralé DC migrují z hematopoetické kmenové buňky v kostní dřeni směrem k primárním lymfatickým orgánům a do submukózní tkáně střev, genitourinárního a dýchacího traktu. Zde fagocytují odpad z buněk, různé další molekuly a dále také cizorodé částice a patogenní organizmy [8], [16].

Některé DC po kontaktu s patogenem, začnou dozrávat. Patogen je endocytován a transportním váčkem přenesen do lysozomu kde je degradován na virové antigeny, které jsou následně prezentovány prostřednictvím MHC-II na povrchu DC. Pokud endocytovaný virus získá přístup k cytoplazmě DC, může být proteazomem zpracován a exprimován na buněčné membráně jako součást MHC-I

receptoru. Signalizace prostřednictvím receptorů nebo detekce prozánětlivých cytokinů vyvolává aktivaci a migraci již zralých DC z periferie směrem k sekundárním lymfatickým orgánům [8]; [16].

Problémem je, že viry včetně HIV, vyvinuly různé strategie, aby se vyhnuly degradačním cestám DC. Je známo, že DC vystaveny HIV dokáží přenášet cytopatickou infekci. Například pomocí mechanismu známému jako trans-infekce, kdy se infikované DC přemisťují z periferních tkání do lymfatických uzlin, kde se HIV přenese z DC na CD4 T-lymfocyty a odtud se virus může snadno dále šířit [24].

### **2.5.2 Interakce DC a B/T-lymfocytů**

Dendritické buňky tedy jsou schopny zachytit antigeny na obvodu, zpracovat a exprimovat jej na buněčném povrchu a spolu s kostimulačními molekulami, iniciovat v sekundárních lymfatických orgánech aktivaci T-lymfocytů. T-lymfocyty společně s B-lymfocyty jsou považovány za hlavní efektorové buňky antigen-specifické imunitní odpovědi. Funkce obou jsou však kontrolovány právě dendritickými buňkami. Rozdílem mezi T a B-lymfocyty je, že B-lymfocyty mohou rozpoznávat antigen přímo po navázání na B-buněčný receptor, T-lymfocyty k rozpoznání antigenu vyžadují předchozí zpracování a prezentaci antigenních peptidů pomocí DC [8]; [16].

V sekundárních lymfatických orgánech zralé DC aktivují prostřednictvím vazby MHC-II na T-buněčný receptor (TCR) antigen-specifické CD4 T-lymfocyty, popřípadě pomocí receptoru MHC-I, CD8+ T-lymfocyty. Schopnost DC aktivovat T-lymfocyty závisí také na sekreci stimulačních cytokinů, jako je IL-12, což je klíčový cytokin pro tvorbu a aktivaci buněk TH<sub>1</sub> lymfocytů a NK-buněk. Pouze několik DC a malé množství antigenu jsou dostatečné k vyvolání silné antigen-specifické odpovědi T-lymfocytů, což ukazuje značnou imunostimulační účinnost DC [8]; [16].



Na membráně DC jsou kromě adhezních molekul exprimovány také lektiny, jako je DC-SIGN, které podporují agregaci DC s T-lymfocyty. Bylo také zjištěno, že zapříčiňují vzájemnou infekci DC a T-lymfocytů, tedy šíření viru v hostiteli. DC-SIGN je lektin typu C, který je schopen vázat Lentiviry, jako jsou SIV a HIV, díky interakci s gp120. Imunohistochemické studie poukazují na expresi DC-SIGN u submukózních a intradermálních DC, a naznačují tak implicitní vliv DC-SIGN na vertikální a slizniční přenos HIV. Bylo prokázáno, že exprese DC-SIGN zvyšuje přenos HIV na T-lymfocyty. DC-SIGN tedy může být mechanismem, při kterém se HIV prostřednictvím DC v mukózních tkáních dostává až do lymfoidních tkání, kde HIV poté může infikovat CD4 T-lymfocyty [8]; [16].

### 2.5.3 Lymfatická tkáň

Lymfatická tkáň představuje hlavní a nejvýznamnější místo pro replikaci HIV viru, během celého průběhu infekce. Část replikace viru probíhá také v hematopoetickém systému. V počáteční fázi infekce je do plazmy uvolněno velké množství HIV, na základě toho se začíná vytvářet HIV specifická cytotoxická T-lymfocytární odpověď, která souvisí s potlačením plazmatické viremie u většiny pacientů. Viriony jsou v lymfatické tkáni vychytávány pomocí sítě folikulárních dendritických buněk (FDC) [8]; [16].

Počet buněk obsahujících provirovou DNA je v lymfatické tkáni 5 - 10krát vyšší než v cirkulujících mononukleárních buňkách periferní krve. Samotná replikace viru HIV je v lymfatické tkáni asi 10 až 100krát vyšší nežli v periferní krvi. Primárním místem zahájení replikace je parakortex mízních uzlin. K přednostní replikaci a větší destrukci CD4 T-lymfocytů však dochází v lamina propria a submukóze střeva, zřejmě díky většímu osídlení CCR5 efektorovými paměťovými CD4 T-lymfocyty, které jsou ideálními cíli pro replikaci HIV [8]; [16].

Od okamžiku infekce virem HIV probíhá neustálá intenzivní replikace viru v cílových buňkách (makrofágy, monocyty, aktivované a klidové CD4 T-lymfocyty).

V brzké fázi infekce se právě v těchto cílových buňkách vytvářejí trvalé rezervoáry virů, zejména pak v latentně infikovaných CD4 T-lymfocytech a makrofázích. Kdy po dokončení reverzní transkripce je možné v cytoplazmě buněk prokázat provirální neintegrovanou HIV DNA (in vitro experimenty ukázaly, že HIV se přednostně integruje do aktivních genů). Z toho vyplývá, že aktivace CD4 T-lymfocytů je důležitá pro integraci DNA HIV do genomu hostitelské buňky a je proto předpokladem pro syntézu nových virionů. V tomto ohledu prostředí lymfatické tkáně představuje optimální milieu pro replikaci viru. Díky blízkému kontaktu mezi CD4 T-lymfocyty a buňkami prezentujícími antigen, přítomností infekčních virionů na povrchu FDC a také bohaté produkci prozánětlivých cytokinů (např. IL-1, IL-6 nebo TNF $\alpha$ ), podporuje zahájení virové replikace v doposud latentních infikovaných buňkách a zesiluje replikaci viru v buňkách, které již virus produkují [8]; [16].

Během přirozeného průběhu onemocnění HIV se počet CD4 T-lymfocytů pomalu snižuje, zatímco plazmatická viremie se u většiny pacientů zvyšuje. Progrese onemocnění se odráží destrukcí architektury lymfoidní tkáně a sníženou schopností zachytit samotný vir [8]; [16].

Genomová analýza virové RNA u pacientů s akutní infekcí HIV ukázala, že u přibližně 80 % infikovaných pacientů je viremie výsledkem infekce jedinou partikulí viru. Většina těchto napadených buněk je během několika dní zničena přímými i nepřímými mechanismy. Další progrese onemocnění závisí do značné míry na schopnosti hostitele rekonstruovat skupinu paměťových buněk v lymfoidní tkáni. Nedávné výzkumy naznačily, že výdej CD4 T-lymfocytů v thymu je během infekce HIV snižován, zvláště u starších pacientů, a že tento defekt je způsoben abnormalitami proliferací T-lymfocytů v buňkách, jejichž mechanismus je stále nedefinovaný, protože thymocyty neexprimují CCR5 a neměly by být tedy nutně cílem HIV [8]; [16].

#### 2.5.4 HLA systém

CD8 T-lymfocyty rozpoznávají specifické antigeny ve spolupráci s molekulami HLA I. třídy na buňkách prezentujících antigen, zatímco CD4 T-lymfocyty vyžadují prezentaci antigenních peptidů v kooperaci s molekulami HLA II. třídy. Vytvoření HIV-specifické imunitní odpovědi tedy závisí na individuálním HLA motivech [8]; [16].

Antigen-prezentující buňky mohou vázat HIV peptidy různými způsoby na molekulách HLA I. třídy. CD8 T-lymfocyty tak mohou být aktivovány optimálním, suboptimálním způsobem nebo nemusí být aktivovány vůbec. Byly také identifikovány HLA motivy spojené s pomalou nebo rychlou progresí onemocnění, z čehož lze usuzovat, že typ HLA může být odpovědný za průběh onemocnění. Homozygizita pro HLA Bw4 je považována za protektivní. Pacienti, kteří vykazují heterozygizitu na lokusech HLA I. třídy, mají charakteristicky pomalejší průběh imunodeficience než pacienti s homozygizitou u těchto lokusů. Počáteční studie ukázala, že HLA B14, B27, B51, B57 a C8 jsou spojeny s pomalou progresí onemocnění, zatímco přítomnost HLA A23, B37 a B49 je spojena s rychlým rozvojem imunodeficience. Nedávné studie naznačují, že u diskordantních párů může mít neshoda v HLA I. třídy ochrannou funkci před heterosexuálním přenosem. U HLA B57 pozitivních pacientů se uplatňuje HLA B57 restrikce CTL zaměřená proti HIV peptidům s lepší imunitní odpovědí [8]; [16].

CD8 T-lymfocyty HIV exponovaných, ale neinfikovaných afrických žen rozpoznávají odlišné epitopy než T-lymfocyty CD8 infikovaných žen. To naznačuje, že epitopy, proti kterým je imunitní systém nasměrován během přirozené infekce, se mohou lišit od těch, které jsou protektivní proti infekci. Vedle toho může individuální HLA motiv ovlivnit adaptivní imunitní odpověď a vývoj únikových virových mutací. U pacientů s HLA B57 a B58 mohou u HIV viru vznikat jisté mutace v genetickém kódu, které umožňují viru uniknout působení CTL. Tyto mutace ve

výsledku vedou ke snížení replikační kompetence a tím ke snížení virové zátěže [8]; [16].

Antigeny HLA II. třídy jsou rozhodující pro vývoj HIV-specifické CD4 T-lymfocytární odpovědi. Identifikace ochranných nebo nepřátelských alel HLA třídy II je méně dobře prozkoumáno než znalost alel u HLA I. třídy. Bylo zjištěno že, HLA DR13 prokazují ochranný účinek před vertikální infekcí HIV [8]; [16].

### **2.5.5 T-lymfocyty a NK buňky**

Na NK buňkách (natural killers) a malé malém množství T-lymfocytů jsou exprimovány transmembránové receptory KIR (killer cell immunoglobulin-like receptors). Tyto receptory KIR představují ligandy, které se váží na HLA I. třídy a fungují jako aktivační nebo inhibiční receptory NK buněk. Bylo prokázáno, že polymorfismy genu KIR souvisí s pomalou nebo rychlou progresí onemocnění HIV. Během infekce HIV mohou být NK buňky nejen sníženy, ale mohou také vykazovat sníženou cytolytickou aktivitu. Předběžné výsledky naznačují, že nízké počty NK buněk jsou spojeny s rychlejším průběhem onemocnění. Imunologický tlak KIR receptorů může vést až k selekci mutant HIV viru schopných uniknout imunologické kontrole, což jednak svědčí pro přímé působení NK buněk na evoluci virů, jednak to podtrhuje význam přirozené imunity v protivirové obraně [8]; [16].

### **2.5.6 HIV-specifická buněčná odpověď**

Cytotoxické T-lymfocyty (CTL) jsou schopny rozpoznat a eliminovat buňky infikované virem. Řada studií jasně demonstruje, že CTL jsou rozhodující pro potlačování replikace HIV a mají významný dopad na progresi onemocnění po infekci. Při srovnávání pacientů infikovaných HIV s rychlým poklesem počtu CD4 T-lymfocytů a dlouhodobých nonprogresorů, mají nonprogresoroví pacienti

vysoké množství HIV-specifických prekurzorů CTL se širokou specificitou vůči různým proteinům HIV [8]; [16].

Byli popsáni někteří jedinci, kteří se po letech stabilizovaného onemocnění v přítomnosti silné CTL reakce vyvinuly mutanty HIV (escape mutanty), kteří byli schopni uniknout z vlivu CTL. Vývoj CTL únikových mutantů byl spojen s rychlým poklesem CD4 T-lymfocytů, což naznačuje ochrannou úlohu CTL. Specifické CTL mohou dokonce zabránit nákaze v případě, že došlo k expozici HIV virem. Výskyt CTL odpovědi nesouvisí pouze s potlačením plazmatické viremie během počáteční fáze HIV infekce. Pacienti, u kterých byla zahájena cART léčba záhy po nákaze a později podstoupily strukturovanou přerušovanou terapii, se i během fáze bez léčby vyskytovaly v krvi HIV-specifické CTL [8]; [16].

V roce 2009 bylo prokázáno, že počáteční reakce HIV-specifických CTL značně přispívá ke kontrole viremie během akutní infekce. Nicméně je stále nejasné proč u většiny pacientů, kteří vykazují na začátku infekce silnou CTL odezvu tato odpověď později zeslabuje. Jako jedno z možných vysvětlení se naskýtají tzv. escape mutanti, jejichž epitopy rozpoznávané CTL a již nejsou imunodominantní. Negativně se však může uplatnit i nef protein, který dokáže regulovat antigeny HLA I. třídy a tím působit proti rozpoznávání infikovaných buněk pomocí CTL. Není jasné, proč většina infikovaných jedinců, přestože vykazuje detekovatelnou CTL odpověď není schopna kontrolovat virus [8]; [16].

Zahájení ART během primární infekce HIV bylo spojeno s perzistencí HIV-specifické CD4 T-lymfocytární odpovědi. Tyto HIV-specifické CD4 T-lymfocyty jsou zaměřeny hlavně proti epitopům odvozených od gag a nef. Bylo prokázáno, že HIV přednostně infikuje aktivované CD4 T-lymfocyty, především HIV-specifické. Proto není v současné době jasné, zda ztráta CTL aktivity specifické pro HIV v průběhu onemocnění odráží instinktivní vadu CTL nebo se vyvíjí sekundárně se ztrátou specifické pomoci CD4 T-lymfocytů [8]; [16].

CD8 T-lymfocyty vykazují kromě samotné cytotoxické aktivity zaměřené proti HIV infikovaným buňkám také pozoruhodnou, produkci solubilní HIV inhibiční aktivity, která inhibuje replikaci HIV v autologních a alogenních buněčných kulturách. Navzdory velkému úsilí nebyla identita této inhibiční aktivity vyjasněna, i když chemokiny, jako je MIP-1a, MIP-1β nebo Rantes, IL-16 a defenziny mohou představovat alespoň část inhibice [8]; [16].

### **2.5.7 Imunitní odpověď TH<sub>1</sub>/TH<sub>2</sub>**

V závislosti na vzorci sekrece cytokinů mohou být CD4 T-lymfocyty diferencovány na TH<sub>1</sub> a TH<sub>2</sub> lymfocyty. TH<sub>1</sub> CD4 T-lymfocyty primárně produkují interleukin-2 (IL-2) a IFN $\gamma$ , které reprezentují cytokiny, které podporují efektorové funkce imunitního systému (CTL, NK-buňky, makrofágy). TH<sub>2</sub> lymfocyty převážně produkují IL-4, IL-10, IL-5 a IL-6, které představují cytokiny, které upřednostňují vývoj humorální imunitní odpovědi. Vzhledem k tomu, že cytokiny TH<sub>1</sub> jsou kritické pro tvorbu CTL, specifická reakce TH<sub>1</sub> na HIV je považována za ochrannou imunitní odpověď. Studie na HIV-exponovaných, ale neinfikovaných jedincích ukázaly, že po in vitro stimulaci HIV-1 env antigeny (gp120 / gp160) a peptidy, T-lymfocyty testovaných jedinců vylučují IL-2 na rozdíl od neexponovaných testovaných osob. Z tohoto pohledu můžeme HIV-1-specifickou imunitní odpověď TH<sub>1</sub> typu považovat za potenciálně ochrannou [8]; [16].

### **2.5.8 HIV-specifická humorální imunitní odpověď**

Souvislosti mezi HIV specifickou humorální imunitní odpovědí a průběhem onemocnění jsou méně dobře prozkoumány. Experimentální údaje naznačují, že tvorba HIV-specifických protilátek je nezbytná pro preventivní očkovací strategie. Naproti tomu vyčerpání B-lymfocytů monoklonální protilátkou namířenou proti B-lymfocytům u opic s již zavedenou infekcí SIV neovlivňuje průběh plazmatické viremie. Pomalá progrese imunodeficiency byla pozorována u pacientů s vysokými

titry anti-p24 protilátek, stálostí neutralizujících protilátek proti primárním a autologním virům a nedostatku protilátek proti některým epitopům gp120 [8]; [16].

Mohutnou neutralizační aktivitu zaměřenou vůči řadě primárních izolátů a perzistenci neutralizujících protilátek proti autolognímu viru HIV vykazují obvykle dlouhodobí HIV nonprogresoři. V současnosti není jasné, zda přítomnost neutralizačních protilátek u těchto osob představuje část ochrany nebo zda pouze odráží integritu relativně intaktního imunitního systému. U exponovaných jedinců, kteří byli vystaveni infekci HIV, ale sami nebyli infikováni, a u nichž tedy nejsou prokazatelné protilátky proti HIV byla prokázána lokální (slizniční) IgA odpověď proti HIV. Právě tyto lokální IgA protilátky, spíše než systémové IgG, jsou spojovány s ochranou před infekcí HIV. Existují také některé důkazy, že určité protilátky proti HIV mohou zvýšit infekci CD4 T-lymfocytů [8]; [16].

U infikovaných jedinců, existují také neutralizační protilátky, avšak ty se objevují s časovou prodlevou. To ve výsledku znamená, že v době, kdy se tyto protilátky vytvoří, již v plazmě cirkulující nové viry, odolné vůči těmto neutralizačním protilátkám. Protilátková odpověď se tedy neustále opožďuje za stále se měnícím cílem, což umožňuje virům trvalý úniku [8]; [16].

V protilátkové obraně proti HIV jsou významné Fc receptory, nikoliv vazba komplementu. Některé neutralizační protilátky rozpoznávají vazebné místo pro gp120 na CD4 receptoru. Neutralizující protilátky často rozpoznávají stabilní epitopy s významem pro vir, výzkum v posledních letech odhalil některé specifické struktury a povrchové glykoproteiny, které jsou zaměřeny na neutralizační protilátky. Podrobnější porozumění těmto mechanismům je velice důležité, k podpoře strategií vakcín zaměřených na léčbu nebo ochranu proti infekci HIV [8]; [16].

## 2.6 Terapie

Úsilí o dosažení úspěšné léčby existovalo již od doby objevení původce HIV infekce. Přes nepochybné úspěchy v oblasti nových virostatik neexistuje doposud žádná dostatečně účinná specifická léčba ani očkovací látka, která by vedla k úplné eliminaci HIV z organismu. Eradikace infikovaných buněk z organismu je možná pouze za cenu destrukce všech těchto buněk, neboť HIV napadá buňky imunitního systému. Zničení imunitních buněk by vedlo k těžkému imunodeficitu, kterému by infikovaná osoba ihned podlehla. Díky nynější dobré znalosti imunopatogeneze viru lze pacientům s touto diagnózou alespoň prodloužit život pomocí antiretrovirové terapie a signifikantně tak snížit riziko vzniku AIDS-definujících, ale také non-AIDS-definujících nemocí a stavů. K terapii se v současné době používají antiretrovirotika. Právě dostupnost těchto léků zcela změnila původní obraz HIV infekce jako fatálního onemocnění. Dnes je zvláště díky dostupné efektivní terapii nákaza vnímána jako nemoc chronická, která nemusí významným způsobem zkrátit délku života postižené osoby [8]; [15]; [20]; [21]; [25].

Primárním cílem antiretrovirové terapie je snížení vysoké morbiditativy a mortality následkem infekce HIV. ART terapie má snahu o co nejefektivnější virologickou a imunologickou odpověď. U virologické odpovědi dojde k útlumu virového množení a díky tomu i ke snížení hladiny viru v krvi, virové nálože, nejlépe pod mez detekovatelnosti. V důsledku toho může dojít ke zlepšení funkce imunitního systému. Imunologická odpověď je doprovázena především nárůstem počtu CD4 T-lymfocytů a dochází k reparaci poškození způsobeného HIV. Obě tyto odpovědi, jak virologická, tak imunologická většinou jdou ruku v ruce, avšak existují i případy, kdy např. snížení replikace viru nevede k očekávanému zlepšení imunitních ukazatelů [5]; [8]; [25].

Antiretrovirotika jsou látky syntetického původu, které jsou zaměřeny na zastavení procesu virového množení. Rozdělujeme je do několika skupin jak podle



chemického složení, tak dle mechanismu účinku. Specifický účinek těchto léků se zaměřuje na inhibici jednotlivých fází replikačního cyklu viru. Zasahuje buď do klíčových enzymů HIV, nebo brání samotnému vstupu viru do buňky. Dle těchto mechanismů účinku dělíme antiretrovirotika používaná v léčbě HIV do pěti, respektive šesti skupin:

1. Inhibice enzymu reverzní transkriptázy – tyto inhibitory jsou:
  - a. nukleosidové (NRTI) /nukleotidové (NtRTI);
  - b. nenukleosidové (NNRTI);
2. Inhibitor vstupu (EI);
3. Inhibitor fúze (FI);
4. Inhibitor integrázy (INSTI);
5. Inhibitory proteázy (PI) [5]; [8]; [3].

V současnosti jsou ve výzkumné fázi i další možnosti terapie HIV pacientů. Ve stádiu výzkumu je například genová terapie, která pracuje s využitím delecí či mutací genů (např. pro chemokinové receptory). Velká pozornost je věnována různým možnostem imunoterapie zaměřené především na obnovu buněčné imunity a indukci specifických cytotoxických lymfocytů. Tato imunoterapie by měla mít své místo u tzv. zbytkové nemoci, tj. po snížení virové nálože antiretrovirovými preparáty. V posledních letech probíhají studie a testují se imunoterapie interleukinem 2 (pro vysokou toxicitu je jeho uplatnění omezeno), ve fázi příprav je také aplikace interleukinu 7 (indukuje mutaci a diferenciaci T-lymfocytů v thymu) nebo interleukinu 15 [20]; [21].

Kromě ART léčby je nutnost HIV-pozitivním pacientům v pokročilých stádiích onemocnění (při CD4 lymfocytech <200 buněk/ $\mu$ l) zabezpečit profylaxi či léčbu oportunních infekcí a tumorů, dostatečnou výživovou podporu atd. Takto komplexně pojatá léčba pak podstatně zlepšuje kvalitu života osob s HIV a snižuje morbiditu a mortalitu [20].

### 2.6.1 Podávání léků

Do poloviny 90. let 20. století byly léčebné možnosti velmi omezené. ART léčiva se podávala jednotlivě nebo v různých, ne zcela definovaných kombinacích. Od 2. poloviny 90. let se začal dodržovat princip vysoce účinné antiretrovirové terapie HAART (highly active antiretroviral therapy, nověji též cART – combination antiretroviral therapy). Principem HAART je kombinace tří nebo více léků nejméně ze dvou lékových skupin. Nejčastěji se jedná o kombinaci dvou nukleosidových inhibitorů RT spolu s nenukleosidovým inhibitorem RT, inhibitorem proteázy nebo integrázovým inhibitorem. Zavedení této kombinované strategie léčby sebou přineslo pozitivní terapeutický efekt. Při HAART dochází k částečné obnově imunitních funkcí, které se projevují vzestupem CD4 lymfocytů s fenotypem 45RA+, tedy tzv. panenských, dokumentujících určitou obnovu funkce thymu a zvýšenou produkci panenských lymfocytů v něm. Léčba HAART s sebou nese i nepříznivé jevy, a to snížení cytotoxických virově specifických T-lymfocytů, zřejmě v důsledku imunopresivního vlivu samotných léků [8]; [21].

### 2.6.2 Inhibitory enzymu reverzní transkriptázy

#### 2.6.2.1 Nukleosidové inhibitory RT

Nukleosidové nebo také nukleotidové inhibitory (nukleoside reverse transcriptase inhibitors, NRTI/ nucleotide reverse transcriptase inhibitors, NtRTI) jsou významnou součástí většiny terapeutických systémů. Po chemické stránce jsou NRTI nukleosidové analogy adenosinu, thymidinu, cytosinu a guanosinu, až na výjimku v podobě tenofoviru, který je chemickým nukleotidem. Tyto léky zasahují do replikace HIV, tím že zabraňují zpětný přepis virové RNA do provirové DNA pomocí začlenění syntetického analogu nukleosidu do vznikajícího řetězce na místo přirozeného. Díky tomuto začlenění dochází k inhibici enzymu reverzní transkriptázy, která nemůže dál pokračovat ve výstavbě provirové DNA a replikační cyklus viru je zastaven [8]; [3]; [25].

Jedná se o historicky nejstarší antiretrovirové léky na léčbu HIV. Jejich zástupce, lék azidothymidin (AZT, též zidovudin) byl schválen a zaveden do terapeutické praxe v roce 1987. Od té doby, se pokračovalo ve vývoji dalších lékových forem tohoto typu. V roce 2001 bylo schváleno klinické použití nukleotidového inhibitoru RT tenofoviru, jehož objevitelem byl český vědec prof. RNDr. Antonín Holý, DrSc. Toto léčivo je v současné době celosvětově nejpoužívanějším antiretrovirotikem. O dva roky později schválila FDA další lék emtricitabin, za jehož objevem stál také profesor Antonín Holý. Prof. Holý stojí i za dalšími antivirotyky využívanými nejen při léčbě HIV, ale také například i u hepatitid typu B [8]; [20]; [25].

NRTI bývají obvykle používány v kombinaci dvou léků z této skupiny, což je označováno jako základ neboli backbone. Například lék Emtricitabin se podává pacientům ve fixní kombinaci (tj. 2 či více účinných látek v jedné tabletě) s tenofovirem. Výhodou NRTI je, že se eliminují hlavně renální exkrecí, takže interakce s jinými léčivy nebývají obvyklé, ovšem velkou nevýhodou je jejich mitochondriální toxicita, která přináší velkou řadu nežádoucích účinků. Další velkou nepříjemností bylo také zjištění průkazu vysokého stupně zkřížené rezistence v této skupině [8]; [25].

#### 2.6.2.2 Nenukleosidové inhibitory RT

Nenukleosidové inhibitory (non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NNRTI) jsou k dispozici k léčbě HIV od roku 1996. Tyto léky blokují reverzní transkripci viru podobně jako NRTI, ovšem mechanismus jejich účinku i chemické složení se od NRTI zcela liší. NNRTI se váží přímo na enzym reverzní transkriptázu, konkrétně na místo alosterického centra, které je v blízkosti aktivního místa enzymu. Vzniklý komplex NNRTI s RT má pouze omezenou afinitu k přirozeným nukleotidům a tím dochází k efektivnímu utlumení funkce RT [8]; [20]; [3].

Nevýhodou NNRTI je vznik zkřížené rezistence mezi jednotlivými představiteli této skupiny léčiv. Z tohoto důvodu se NNRTI aplikuje pouze v kombinaci s jinou skupinou využívající odlišný mechanismus působení, než má NNRTI. Nejčastěji tvoří terapeutickou kombinaci s NRTI, kde nedochází ke zkřížené rezistenci mezi těmito skupinami léčiv, popřípadě je možná kombinace NNRTI i s PI. Kombinace s NRTI má značnou výhodu v tom, že vede k značné supresi replikace viru, z tohoto důvodu je doporučována jako první volba u HIV terapeuticky naivních pacientů [3]; [25].

NNRTI jsou pacienty obvykle dobře tolerovány, s výjimkou vzniku exantému projevujícím se především u zástupců první generace např. efavirenzu, který sebou nese i neuropsychické účinky. Mezi zástupce novějších léků, které se snaží v co nejvyšší míře eliminovat vedlejší účinky řadíme etravirin a rilpivirin [8]; [25].

### **2.6.3 Inhibitory vstupu**

Inhibitory vstupu (entry inhibitors, EI), prezentují novou skupinu chemicky odlišných komponent, jejichž cílem jsou proteiny a receptory buněk hostitele. Samotný vstup viru do hostitelské buňky je první fází replikačního cyklu HIV. Jedná se o vícestupňový složitý proces, při kterém HIV používá ke vstupu do buňky chemokinové koreceptory (CCR5 nebo CXCR4). Chemokinové receptory jsou nepostradatelné k tomu, aby se virová partikule dokázala navázat na cílovou buňku a následně do ní pronikla. Inhibitory vstupu se vážou právě na tyto chemokinové koreceptory na povrchu buňky hostitele, tak zabrání vazbě virového glykoproteinu gp120 na koreceptor a nedovolí HIV viru vstoupit do buňky a replikovat se v ní [25]; [26].

Určitým problémem u této terapeutické skupiny je právě existence dvou typů chemokinových koreceptorů. Jediný přípravek, jenž je dosud z této skupiny léčiv používán je maraviroc, který je nízkomolekulárním inhibitorem CCR5. Problémem ovšem je, že není účinný proti virům, které využívají pro vstup receptor CXCR4,

z tohoto důvodu je nutné před nasazením maraviroc laboratorně prokázat tropismus, tedy schopnost vazby viru k CCR5. Užívání léku je pacienty dobře tolerováno a přináší obvykle pozitivní výsledky, proto se na tuto relativně novou lékovou skupinu upíná velká pozornost a je snaha o vývoj nových antiretrovirotik tohoto typu [8]; [25]; [27].

#### **2.6.4 Inhibitory proteázy**

Inhibitory HIV proteáz (protease inhibitors, PI) představují velmi účinnou skupinu antiretrovirotik a jejich zavedení do praxe v roce 1995, znamenalo obrovský posun vpřed v oblasti léčby HIV infekce. Pro klinické použití je dostupná dosti početná skupina těchto léků. PI účinkují na samém konci replikačních cyklů HIV, kde inhibují činnost virových enzymů – HIV proteáz. Tyto proteázy jsou kódovány v genomu HIV a jsou nezbytné pro naštěpení dlouhých polyproteinových řetězců (gag-pol). Z vytvořených štěpů se poté tvoří nové infekční virové partikule. PI dokáží tuto část maturace nových virionů zastavit tím, že se kompetitivně naváží na aktivní místo pro HIV proteázu. Díky navázání PI se znemožní navázání samotné proteázy, tedy vzniku plně funkčních virových částic. Vytvoří se pouze defektní virové částice, které nejsou schopny napadat a infikovat další lidské buňky [8]; [15]; [3].

PI jsou metabolizovány v organismu pomocí jaterního cytochromu P450, tato skutečnost značně limituje samotné léčivo, díky faktu, že zde může docházet ke vzájemným interakcím s léky na různá onemocnění, které se tímto způsobem také metabolizují. Tyto léky pak mohou významně ovlivňovat aktuální hladiny PI, snižovat je až pod terapeutickou hodnotu nebo naopak značně navyšovat, kdy může docházet až k fatálním případům intoxikace. Snahou o zamezení těchto lékových interakcí, je využívání farmakokinetického boostování PI ritonavirem. Ritonavir je v nízké dávce podáván společně s PI, aby zpomalil jeho metabolické pochody. Takovéto zlepšení farmakokinetiky PI umožňuje prodávání léku v nižších dávkách

a delších intervalech, což má za následek menší výskyt nežádoucích účinků, které jsou právě u PI velice časté [8]; [3].

Odhaduje se, že denně vzniká přibližně 1010 virových částic, PI většinou v kombinaci s NRTI nebo NNRTI může dokázat utlumit replikaci HIV tak, že v plazmě postižené osoby je přítomno jen velice malé množství HIV částic. V současnosti řadíme mezi nejvíce používaná PI lopinavir, který obsahuje již přímo ritonavir, dále pak atazanavir, který je pacienty dobře snášen a v neposlední řadě také darunavir [8]; [20].

### **2.6.5 Inhibitory integrázy**

Inhibitory integrázy (integrase stand transfer inhibitors, INSTI) jsou užívány v klinické praxi od roku 2008. Tyto léky dokáží blokovat enzym HIV integrázu, která uskutečňuje integraci provirové DNA do DNA hostitelského chromozomu. Hlavními zástupci této skupiny léčiv jsou raltegravir u něhož byla na základě klinických studií potvrzena vysoká aktivita proti HIV u multirezistentních pacientů. Dalšími zástupci jsou elvitegravir a dolutegravir. Všechny tyto léčiva jsou především určena pro „záchrannou léčbu“. Závažné nežádoucí účinky zatím nebyly u INSTI zaznamenány a výhodou je také jejich velmi malý interakční potenciál [8]; [25].

### **2.6.6 Inhibitory fúze**

Inhibitory fúze (fusion inhibitors, FI) byly povoleny pro klinické používání v roce 2003. FI jsou látky, které zabraňují průniku virové partikule HIV do cílové buňky. Doposud je v klinické praxi používán pouze jeden lék tohoto typu a to enfuvirtid. Enfuvirtid je z chemického hlediska syntetický peptid, který se dokáže extracelulárně kompetitivně vázat na HR1 doménu virového povrchového glykoproteinu gp41 viru HIV, díky tomu, že jeho molekula koresponduje s alfa-helixem HR2 gp41. Navázání léku na HR1 gp41 viru HIV, zabraňuje změně

konformace daného glykoproteinu, proces fúze se tak zastaví a vir se nedostane do cílové buňky. Enfuvirtid má velkou nevýhodu v injekčním podání, které není pro pacienty komfortní a také dochází k vznikům bolestivých rezistencí v oblasti místa vpichu. Lék je převážně určen ke kombinované léčbě HIV a v současnosti má většinou v léčbě okrajový význam, podává se pouze jako záložní či záchranný lék u pacientů s přítomností mnohočetných rezistencí. [8]; [20]; [3].

### **2.6.7 Indikace k zahájení léčby**

K zahájení léčby u HIV pozitivních pacientů existují doporučené postupy, které přesně specifikují, u kterých pacientů a ve které fázi onemocnění je vhodné zahájit ART léčbu. U postižených s klinickými projevy, tedy při HIV-symptomatickém onemocnění, také při postexpoziční profylaxi nebo u HIV-pozitivních těhotných žen je doporučeno zahájit léčbu infekce ihned, bez ohledu na laboratorní ukazatele [8]; [20].

Symptomatictí pacienti s chronickou HIV infekcí jsou nejčastěji indikováni k zahájení farmakologické ART terapie, neboť je u nich vysoké riziko progresse onemocnění do stádia AIDS nebo dokonce smrti. Značným problémem je vysoký výskyt nežádoucích účinků terapie a častý vznik rezistence vůči léčivu. Z tohoto důvodu jsou v praxi, této skupině pacientů obvykle předepisovány léky pouze v kombinaci a v režimu HAART [3].

Antiretrovirotika jsou ihned podávána také osobám, které byly vystaveny riziku nákazy ať už prostřednictvím krvavého poranění kontaminovaným předmětem nebo pohlavním stykem. K těmto situacím dochází například u zdravotníků, kteří přišli do kontaktu s krví HIV pozitivního jedince nebo u osob, které se staly obětí znásilnění. Postexpoziční profylaxi je nutné zahájit nejpozději do 48 hodin a vybírá se obvykle trojkombinace ART, které jsou podávány po dobu 4 týdnů. Úspěšnost léčby při včasném zahájení terapie přesahuje 90 % [8]; [3].

HIV pozitivní těhotné ženy jsou léčeny cART a to z důvodů snahy minimalizovat riziko přenosu infekce vertikální cestou, tedy z matky na plod. Léčba se zpravidla zahajuje mezi 12. a 14. týdnem těhotenství, a to u žen, které dosud neužívaly antivirovou léčbu. ART léčba spolu s porodem císařským řezem, používáním náhražek mateřského mléka a přechodným podáváním ART novorozenci snižuje riziko přenosu HIV na 0,5-8 % [8]; [3].

U asymptomatických HIV-pozitivních osob, jsou rozhodující laboratorní ukazatele. Nejvýznamnějším laboratorním ukazatelem je aktuální hladina CD4 T-lymfocytů, kde hodnoty pod 350/ $\mu$ l jsou dle doporučených postupů indikační pro nasazení ART léčby. Další laboratorním ukazatelem, který je důležitý pro nasazení terapie je hodnota virové nálože. Při množství HIV RNA nad 100 000 kopií/ml je u pacienta nasazena léčba z důvodu velké replikační aktivity viru [8]; [20].

Kritéria pro zahájení antiretrovirové terapie byla na podkladě observačních studií během let posouvána do ranějších stádií. Hlavním milníkem tohoto vývoje směrem k časnějšímu zahájení ART terapie je multicentrická randomizovaná studie Strategic Timing of Antiretroviral Therapy (START) I. studie, která statisticky dokázala jednoznačný benefit z brzkého zahájení ART i u pacientů asymptomatických, s vysokým absolutním počtem CD4 lymfocytů  $>500$  buněk/ $\mu$ l, a to jak v četnosti AIDS-definujících onemocnění, tak non-AIDS-definujících onemocnění. Včasné zahájení léčby však s sebou přináší značné množství otázek. Přestože u pacientů nebyla zaznamenána výrazně vyšší míra nežádoucích účinků, které s sebou ART léčba nese, v úvahu se musí brát i vedlejší účinky ART při dlouhodobém (celoživotním) užívání. Tyto dlouhodobé účinky nejsou dostatečně definované a nejsou doposud k dispozici patřičné relevantní údaje exaktně objasňující tyto sekundární fenomény [28].



## 2.7 Diagnostika HIV

Diagnostika onemocnění HIV se rozděluje do dvou kategorií, klinickou a laboratorní. Klinická diagnostika, je prováděna lékařem na základě příznaků onemocnění a celkového stavu pacienta. Laboratorní diagnostika je prováděna v laboratořích na základě výsledků skupiny testů biologického materiálu od pacienta. Diagnostika nám pomůže rozpoznat v jaké fázi je onemocnění a jakou léčbu pacientovi nasadit, popřípadě jak je léčba účinná [7].

Předpokladem pro stanovení infekce virem HIV, stejně jako diagnózy onemocnění AIDS je laboratorní diagnostika. Laboratorní diagnostika virových infekcí může být přímá, kde stanovujeme virus pomocí antigenu či jeho samotnou izolací, nebo nepřímá, sérologická, která je zaměřena na průkaz tvorby protilátek [7].

Hlavní legislativní normy řešící problematiku HIV/AIDS V ČR:

- Zákon č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví (§§ 71-74).
- Vyhláška MZ ČR č. 143/2008 Sb., o požadavcích na zajištění bezpečnosti a jakosti lidské krve a jejích složek.
- Vyhláška MZ ČR č. 422/2008 Sb., o požadavcích na zajištění bezpečnosti a jakosti lidských tkání a buněk.
- Vyhláška MZ ČR č. 306/2012 Sb., o podmínkách předcházení vzniku a šíření infekčních nemocí.
- Metodické opatření k řešení problematiky infekce HIV/AIDS v ČR, Věstník MZ ČR, částka 8, srpen 2003 [8].

### 2.7.1 Organizace laboratorního vyšetření HIV/AIDS V ČR

Dle zákona č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví (§ 71), lze provést vyšetření přítomnosti viru lidského imunodeficitu jen se souhlasem fyzické osoby. Bez souhlasu fyzické osoby lze test provést pouze:

- a) u těhotných žen;
- b) u fyzické osoby, která má poruchu vědomí a u níž vyšetření na virus HIV je významné z hlediska diferenciální diagnostiky a léčení bez provedení tohoto vyšetření může vést k poškození jejího zdraví;
- c) u fyzické osoby, které bylo sděleno obvinění z trestného činu ohrožování pohlavní nemocí včetně nemoci vyvolané virem HIV nebo z trestného činu, při kterém mohlo dojít k přenosu této nákazy na jiné fyzické osoby;
- d) u fyzické osoby, která je nuceně léčena pro pohlavní nemoc [8]; [29].

Povinné screeningové vyšetření se provádí u dárců krve, tkání, orgánů a spermatu. Screening na přítomnost HIV se provádí při každém darování. U dárek mateřského mléka se provádí povinné vyšetřování na přítomnost HIV jednorázově, před započítáním dárcovství. Bez testu na HIV není darování přípustné [29].

### 2.7.2 Laboratorní vyšetřování HIV

Zákon č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví také definuje zdravotnické zařízení, které může provádět laboratorní vyšetřování HIV. Toto zařízení musí mít oprávnění k vyšetřování HIV udělené na základě povolení příslušného orgánu ochrany veřejného zdraví (OOVZ). Ten povolení vydá, jestliže zdravotnické zařízení splňuje tyto podmínky:

- a) pracoviště, kde se laboratorní vyšetřování provádí je přístrojově a materiálově vybaveno;
- b) vedoucí laboratoře má požadované vysokoškolské vzdělání a doklad o školení v Národní referenční laboratoři pro nákazu vyvolanou virem lidského imunodeficitu (NRL pro HIV/AIDS);
- c) všechny reaktivní výsledky vyšetření HIV získané ve screeningovém testu je zdravotnické zařízení povinno odeslat k provedení konfirmačního testu v NRL pro HIV/AIDS;

- d) plní povinnost měsíčního hlášení počtu vyšetření HIV a jejich výsledků, hlášení zasílá do NRL pro HIV/AIDS;
- e) na vyzvání určené organizace je zdravotnické zařízení, povinno účastnit se systému externího hodnocení kvality diagnostiky HIV [8]; [29].

### 2.7.3 Kategorie laboratorního vyšetření HIV

- Základní,
- konfirmační,
- speciální.

#### 2.7.3.1 Základní vyšetření HIV

Základní vyšetření HIV se dá rozdělit do několika skupin. Vyšetření dárců krve, plasmy, buněk, tkání, orgánů, mateřského mléka a těhotných žen. Tato vyšetření se řadí do skupiny povinných screeningových a jsou hrazena zdravotní pojišťovnou (u pojištěných pacientů). Ze zdravotního pojištění je hrazena i další skupina, kterou tvoří vyšetření indikovaná lékařem, tzv. vyšetření diagnostická [8].

Pacienti, kteří si nechají testovat na vlastní žádost mají dvě možnosti. Mohou se nechat vyšetřit pod svými identifikačními údaji, popřípadě česká legislativa umožňuje anonymní test pod kódem. Jedná se o jedinou výjimku, kdy zákon povoluje anonymní test. Vyšetření je hrazeno žadatelem, u anonymního testování je možnost úhrady z dotačního programu Ministerstva zdravotnictví ČR, pokud je vyšetřovací pracoviště smluvním příjemcem dotace [8].

Vyšetření v rámci prevence jsou nejčastěji hrazena zadavatelem (např. OOVZ, nadvládní organizace atd.). Testují se osoby s předpokládaným zvýšeným rizikem infekce HIV, například drogově závislí jedinci aplikující si drogu intravenózně, pracovníci v oblasti komerčního sexu nebo vězni. Do této skupiny jsou také řazeny vyšetření v rámci odborných studií, které jsou nejčastěji hrazeny z dotací MZ ČR.

Mezi preventivní testování je řazeno také předoperační vyšetření, které hradí zdravotní pojišťovna [8].

Všechny tyto kategorie jsou vyšetřovány v laboratoři oprávněné k testování HIV. Nejčastěji je využíváno nepřímé metody stanovení protilátek vůči HIV enzymovou imunoanalýzou (EIA). V případě reaktivity vzorku není laboratoř oprávněna vydat pozitivní výsledek, výsledek je označen jako reaktivní a putuje ke konfirmaci [8].

#### 2.7.3.2 Konfirmační vyšetření HIV

Všechny reaktivní nálezy, které se vyšetřovaly EIA metodou ve zdravotnických zařízeních, které mají povolení provádět laboratorní vyšetřování HIV jsou zasílány do Národní referenční laboratoře pro HIV/AIDS (NRL pro HIV/AIDS) ke konfirmaci. Potřebnost této konfirmace dokládají také data, které uvádí že HIV infekce je potvrzena pouze u cca 15 % reaktivních vzorků poslaných do NRL ke konfirmaci. Za pozitivní výsledek lze označit pouze ten, který byl ověřený právě konfirmačním vyšetřením. Veškerá konfirmační vyšetření jsou u pojištěných pacientů hrazena z pojištění, u nepojištěných jedinců hradí vyšetření zadavatel, u anonymních vyšetření pak žadatel nebo zadavatel [8].

##### 2.7.3.2.1 Konformačních vyšetření v NRL pro HIV/AIDS

Reaktivní vzorek séra nebo plazmy zaslaný na konfirmaci musí být dodána v co největším objemu, který lze z důvodu provádění několika testů. Nutné je také se vzorkem posílat vyplněnou žádanku o konfirmačním vyšetření HIV. Samotné konfirmační vyšetření je pak sestaveno ze dvou či více EIA testů 4. generace, volba testu zohledňuje, jakým testem bylo provedeno základní vyšetření. Dalším vyšetření je konfirmační test western blot, případně imunoblotový test pro vyloučení HIV-2 infekce. V indikovaných případech se stanovuje samostatný antigen p24 a v případě reaktivity i test konfirmace antigenu p24 [8].

### 2.7.3.3 Speciální vyšetření HIV

Mezi speciální vyšetření se řadí stanovení virové nálože neboli množství viru v krvi, prokazované jako množství kopií HIV RNA v mililitru plasmy. Díky tomuto stanovení můžeme monitorovat rozvoj infekce a také průběh léčby [8].

Dalším speciálním vyšetřením je genotypizační stanovení rezistence vůči antiretrovirotikem, zjištěním tropismu HIV pro indikaci určitého léčebného preparátu nebo stanovení genotypu viru HIV-1 skupiny M. Tyto vyšetření jsou indikována HIV centry a centrálně je provádí NRL pro HIV/AIDS [8].

### 2.7.4 Rychlé testy

Rychlé testy umožňují přímý průkaz anti-HIV protilátek nebo dokonce i antigenu p24 v krvi či slinách, respektive ve stěru z dásní. Výhodou těchto testů je, že poskytují výsledek během pár minut. Citlivost a specifčnost těchto metod je v dnešní době již na vysoké úrovni, testy jsou však stále pouze orientační. Určené jsou k použití ve specifických situacích, kdy běžné laboratorní vyšetření není možné nebo je potřebné znát rychle výsledek, například při zásazích záchranářů, policie, také při testování v rizikových skupinách, například u osob zabývajících se komerčním sexem, v gay klubech nebo u injekčních uživatelů drog [8].

Rychlé testy musí být certifikované a vyšetření může provádět pouze zdravotník nebo řádně proškolený pracovník. Rychlé testy pro domácí testování nejsou v České republice zatím certifikovány. Každý reaktivní výsledek musí vést k laboratornímu vyšetření z odběru žilní krve a konfirmaci nálezu standardním postupem [8].

Hlavním problémem při užití rychlých testů spočívají ve validním provedení, interpretaci výsledku a dostupnosti i kvalitě předtestového a potestového poradenství [8].

### 3 CÍL PRÁCE

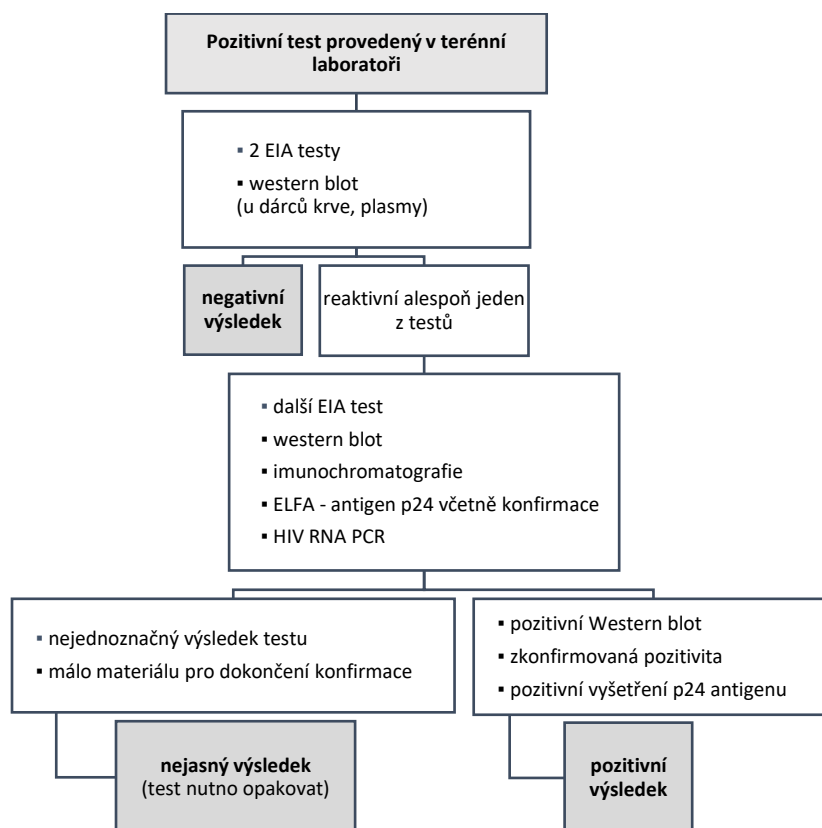
Cílem bakalářské práce je podat ucelený přehled diagnostických postupů k průkazu infekce virem HIV, jejich principy a využití těchto metod v klinické praxi. V práci budou představeny současné diagnostické metody a možnosti s ohledem na nejmodernější používané postupy, které vyhovují právním normám pro Českou republiku.

Součástí práce je také podání informací o současné epidemiologické situaci v České republice a problematice testování krevních vzorků v transfuzní službě.

## 4 METODIKA

### 4.1 Přijetí a postup konfirmace reaktivního vzorku v NRL pro HIV/AIDS

Každý vzorek, který je do NRL pro HIV/AIDS zaslán ke konfirmaci musí být doprovázen kompletně vyplněným průvodním listem ke konfirmačnímu vyšetření HIV reaktivního vzorku. Průvodka obsahuje informace o zadavateli a pacientovi, kdy a jakým testem byl první záchyt reaktivity proveden a informace o ošetřujícím lékaři, pokud zadavatelem nebyl samotný lékař. V případě positivity vzorku je informován právě uvedený lékař. Vzorek (sérum či plasma) je nutné dodat v maximálním možném objemu z důvodů provádění mnoha konfirmačních testů. Vzorky jsou následně v laboratoři řádně označeny a dokumentovány, aby nemohlo dojít k záměně biologického materiálu pacienta s HIV virem a zdravého jedince [8].



Obr. 4 - Postup konfirmace vzorku v NRL pro HIV/AIDS (upraveno dle [30]).

## 4.2 Enzymová imunoanalýza (EIA)

### 4.2.1 Popis metody

Enzymová imunoanalytická metoda (EIA) je označení pro skupinu imunoanalytických metod, které ve fázi detekce používají enzymovou reakci. Tyto metody vycházejí z toho, že na molekuly reaktantů (dle uspořádání testu může být detekčním reagens antigen, protilátka nebo oboje) lze kovalentně navázat molekuly enzymu, aniž by se porušila funkce enzymu či reaktantů. Volí se enzym, jenž dokáže katalyzovat vznik barevné reakce po přidání vhodného substrátu. Pozitivní reakce se projeví změnou zbarvení reakčního roztoku. Lze měřit také spektrofotometricky intenzitu vzniklého zbarvení, které je přímo úměrné množství navázané detekční protilátky, tedy koncentraci prokazovaného antigenu ve vzorku. Díky této metodě tedy můžeme nejen prokázat přítomnost hledané reakční složky (kvalitativní stanovení – antigenu, protilátky), ale stanovit i její množství (kvantitativní stanovení) [31]; [32].

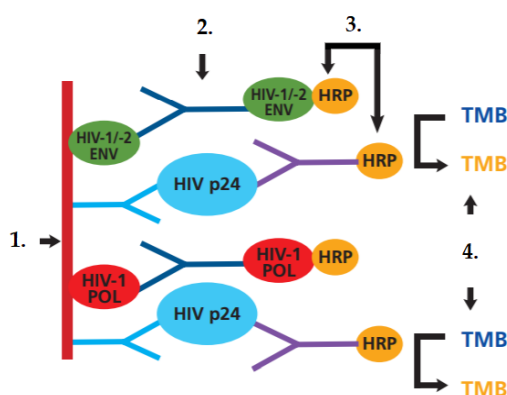
Nejznámější a nejčastěji používanou metodou EIA je ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). K průkazu HIV se využívá nepřímá diagnostika, kdy se anti-HIV protilátky stanovují běžně pomocí kompetitivní ELISA. Výhodou této metod je možnost automatizace, která umožňuje velké množství vyšetřených vzorků. V současné době existuje celá řada certifikovaných testů, které umožňují diagnostikovat infekce vyvolané HIV-1 skupiny M i skupiny O a také virem HIV-2. Z důvodů rozsáhlého diagnostického okna u stanovení protilátek anti-HIV, byla zavedena EIA čtvrté generace, kdy se souběžně s testováním protilátek testuje i přítomnost virového kapsidového antigenu p24. Tento virový antigen p24 je přítomen v krvi infikované osoby již v časně fázi HIV infekce. Díky tomuto rozšířenému testování došlo ke zkrácení diagnostického okna přibližně o 6 dní a používání této dvojkombinace je v ČR povinné pro screening dárců a doporučováno pro screening těhotných žen a pro diagnostické vyšetření [31]; [32].



#### 4.2.2 Pracovní postup

V NRL pro HIV/AIDS jsou využívány ke confirmaci vzorků pomocí sendvičové ELISA metody testovací soupravy Murex HIV Ag/Ab Combo od společnosti DiaSorin a soupravy Genscreen Ultra HIV Ag-Ab od společnosti Bio-Rad. Obě dvě soupravy jsou založeny na podobném pracovním postupu, níže uvedený postup je převzat z návodu pro testovací soupravu od společnosti DiaSorin. Postup analýzy (Obr. 5) zahrnuje následující kroky.

1. V jamkách mikrotitrační destičky jsou navázány HIV-1 a HIV-2 specifické ENV a POL antigeny a monoklonální protilátky proti p24 HIV-1.
2. Do jamek mikrotitrační destičky je přidán vzorek a kontroly. Pokud jsou ve vzorku přítomny antigeny HIV, navážou se na monoklonální protilátky vázané na pevnou fázi. HIV-1 a/nebo HIV-2 protilátky, pokud jsou některé přítomny, se naváží na antigenní struktury imobilizované v jamce.
3. Po inkubaci a promytí je přidán konjugát, který obsahuje protilátky proti antigenu p24 a HIV-1 a HIV-2 proteinů konjugovaných s peroxidázou (HRP).
4. Po inkubaci a promytí nenavázaného konjugátu a za přítomnosti substrátu (TMB) se projeví přítomnost komplexních konjugátů změnou barvy substrátu.
5. Absorbance je následně měřena pomocí spektrofotometru. Naměřená hodnota rozhoduje o přítomnosti nebo nepřítomnosti HIV antigenu nebo protilátky HIV-1 a/nebo HIV-2 [33].



Obr. 5 – Princip sendvičové metody ELISA [33].

V NRL pro HIV/AIDS je kromě testovacích souprav, které se pipetují ručně a následně pouze spektrofotometricky odečítají využíváno analyzátoru ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo od společnosti Abbott. Tento analyzátor funguje na podobném principu jako předchozí ELISA metody, pouze s tím rozdílem, že vše je automatizováno a je tudíž eliminována možná chyba způsobená lidským faktorem. Dalším rozdílem je, že se nejedná o ELISA metodu, ale CMIA (Chemiluminiscent Microparticle Immunoassay), tedy ve výsledném měření se neměří absorbance, ale přítomnost či nepřítomnost antigenu p24 HIV nebo HIV-1 / HIV-2 protilátek pomocí porovnání chemiluminiscenčního signálu [34].

#### **4.2.3 Validace a interpretace výsledků**

Všechny testy, obsahují negativní a pozitivní kontrolu, která musí splňovat určité hodnoty absorbancí (u CMIA chemoluminiscenci).

O přítomnosti nebo nepřítomnosti zjištělých antigenů HIV nebo protilátek proti HIV-1 a/nebo HIV-2 rozhoduje srovnání hodnoty cut-off a absorbancí naměřených u jednotlivých vzorků. Vzorky jejichž optická hustota je nižší, než je hodnota cut-off jsou považovány za negativní. Vzorky s optickou hustotou vyšší nebo rovnou hodnotě cut-off jsou považovány za primárně pozitivní. Před definitivní interpretací by měly být vzorky znovu dvakrát testovány [35].

### **4.3 Western blot**

#### **4.3.1 Popis metody**

Western blot je jednou z nejvýznamnějších diagnostických metod využívaných při confirmaci potenciálně pozitivních HIV vzorků. Test je založen na metodě nepřímé ELISA probíhající na nitrocelulosovém stripu, který obsahuje všechny proteinové složky viru HIV-1 nebo HIV-2 a vnitřní kontrolu [31].

Nitrocelulózový strip je připraven následující způsobem: purifikovaný HIV vir je nejdříve rozdělen pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu na inaktivované proteinové a glykoproteinové frakce podle své molekulové hmotnosti. Rozdělené frakce se následně elektroforeticky přenesou na nitrocelulózový strip. Tyto stripy jsou již komerčně prodávány a není potřeba si je v laboratoři připravovat [31].

#### **4.3.2 Princip metody western blot**

V NRL HIV/AIDS je využíván ke confirmaci vzorku pomocí metody western blot testovací souprava New LAV Blot I Assay od společnosti Bio Rad. Obecný pracovní postup pro tuto metodu je následovný.

1. Rehydratace komerčně vyrobeného nitrocelulózového stripu.
2. Inkubace s confirmovanými vzorky (sérum či plazma odebraná do protisrážlivých činidel na bázi EDTA, heparinu, citrátu) nebo kontrolním sérem. Jestliže jsou přítomny anti-HIV protilátky, naváží se na definovaný virový protein přítomný na stripu.
3. Po promytí následuje inkubace s protilátkami proti lidskému IgG, značenými alkalickou fosfatázou. Konjugát se váže na anti-HIV protilátky, zachycené na pevné fázi.
4. Po promytí a odstranění přebytečného konjugátu chromogenní roztok umožňuje prokázat enzymovou aktivitu komplexu navázaného na stripu.
5. Vznik specificky obarvených proužků je důkaz anti-HIV protilátek ve vzorku. Každý proužek odpovídá přítomnosti protilátky proti příslušnému virovému antigenu [36].

#### **4.3.3 Validace a interpretace výsledků**

Validace výsledků u testovací soupravy New LAV Blot I Assay od společnosti Bio Rad je zaopátrána kontrolním proužkem anti-IgG, který se musí silně zabarvit.

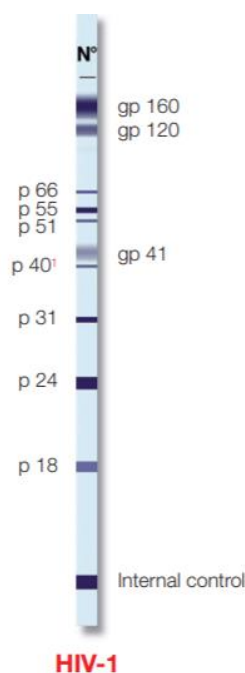
Pokud se proužek nezbarví nebo je jeho intenzita nízká, poukazuje tato skutečnost, na nenapipetování vzorku eventuálně reagentie, nebo na nedodržení postupu testu. Součástí validace je také pozitivní a negativní kontrola. U pozitivní kontroly jsou zbarveny všechny proužky u negativní pouze kontrolní proužek [36].

Přítomnost protilátek proti proteinovým složkám HIV-1 v kontrolních vzorcích je prokázána vznikem specificky zbarvených proužků. Jejich pozice odpovídá molekulárním hmotnostem proteinů viru HIV uvedených v tabulce (Tab. 1) [36].

Tab. 1 – Popis western blotového stripu [36].

Označení	Genom	Charakter	Vzhled na western blotu
GP 160	ENV	Prekursor GP 110/120 a GP 41	Proužek s difusními okraji
GP 110/120	ENV	Obalový glykoprotein	Proužek s difusními okraji
P 68/66	POL	Reversní transkriptáza	Jasný proužek
P 55	GAG	Prekursor korového proteinu	Dubleta
P 52/51	POL	Reversní transkriptáza	Jasný proužek
GP 41	ENV	Transmembránový glykoprotein	Difusní proužek
P 40	GAG	Prekursor korového proteinu	Jasný proužek
P 34/31	POL	Endonukleáza	Jasný proužek
P 24/25	GAG	Korový protein	Jasný proužek
P 18/17	GAG	Korový protein	Někdy dubleta

NRL pro HIV/AIDS využívá pro interpretaci výsledků kritéria WHO. Vzorek je hodnocen jako pozitivní, pokud jsou na western blotovém stripu patrné dva proužky odpovídající genomu ENV a alespoň jeden proužek odpovídající genomu GAG nebo POL. Jako neurčitý je hodnocen vzorek, který má viditelný pouze jeden proužek odpovídající genomu ENV a jednomu GAG nebo POL, popřípadě pouze GAG a POL nebo jen GAG či POL. Negativní vzorek je tehdy, pokud není na stripu viditelný žádný proužek nebo jsou proužky neklasifikovatelné [36].



Obr. 6 - Western blotový strip – pozitivní kontrola<sup>[37]</sup>.

## 4.4 Imunochromatografie

### 4.4.1 Popis metody

Metoda kombinující elektroforézu v uspořádání pro dělení směsí proteinů dle jejich molekulové hmotnosti s imunoanalytickým průkazem specifické protilátky zachycené v komplexu antigen × protilátka [32].

Testovaná směs proteinových antigenů se nejprve elektroforeticky rozdělí podle velikosti molekulové hmotnosti a následně se provede otisk elektroforegramu na vhodnou matici (obvykle nitrocelulózová membrána) pomocí elektrického proudu. Volná vazebná místa na matici se vysytí inertní bílkovinou. V další fázi následuje vlastní imunodetekce, kdy se na matici kápne vzorek pacienta, který obsahuje prokazované protilátky. Po inkubaci se vzniklé imunokomplexy vizualizují pomocí sekundární protilátky s chemicky navázanou značkou [32].

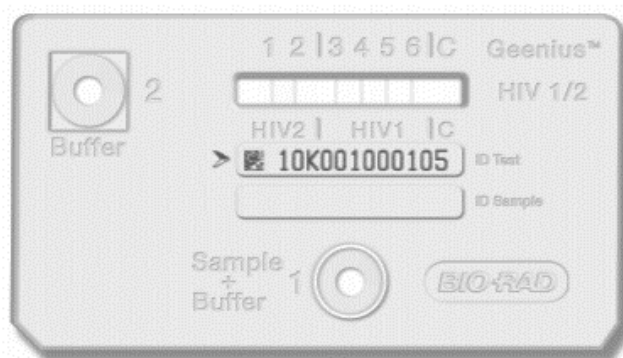
#### 4.4.2 Pracovní postup

V NRL HIV/AIDS je využíván imunoblotový test především pro vyloučení infekce virem HIV-2. Využívaná je testovací souprava Geenius HIV 1/2 Confirmatory Assay od společnosti Bio Rad. Tato testovací souprava využívá protilátku vázající protein A, který je konjugován s barvicími částicemi koloidního zlata jako konjugát a HIV-1 (p31, gp160, p24, gp41) a HIV-2 antigeny (gp36, gp140), které se vážou na pevnou fázi membrány. Obecný pracovní postup pro tuto metodu je následovný.

1. Vzorek (plné krve, séra nebo plazmy) se aplikuje do příslušných jamek (v dané testovací sadě do jamek označených SAMPLE + BUFFER).
2. Jakmile se vzorek a pufr přesunou na testovací proužek, přidá se další pufr. Daný pufr usnadňuje laterální tok uvolněných produktů a podporuje vazbu protilátek na antigeny.
3. V reaktivním vzorku jsou protilátky anti-HIV zachyceny imobilizovanými antigeny (v dané testovací sadě v TEST oblasti): protein A konjugovaný s koloidním zlatem se váže na zachycené protilátky a vytváří barevné zbarvené (u dané testovací sady růžové/fialové) proužky.
4. Pokud nejsou přítomny protilátky proti HIV, pak se nevytvářejí žádné barevné proužky.
5. V obou případech vzorek i nadále migruje kolem membrány a vytváří růžový/fialový proužek v kontrolní zóně (v dané testovací sadě zóna nazvaná CONTROL (C)) oblasti, kde dochází k imobilizaci proteinu A.
6. IgG ze vzorku se váže na protein A, který je imobilizován v kontrolní zóně pevné fáze membrány a vytváří barevný proužek.
7. Kontrolní proužek slouží k indikaci toho, že vzorek a reagentie byly správně naneseny a migrovaly v rámci kazety [38].

Testovací kazeta (Obr. 7) obsahuje kontrolní pruh (C) a šest testovacích proužků, které jsou na kazetě očíslovány podle následujícího schématu:

- pruh 1: gp36 (HIV-2, obalový peptid) HIV-2 ENV;
- pruh 2: gp140 (HIV-2, obalové peptidy) HIV-2 ENV;
- pruh 3: p31 (HIV-1, polymerázový peptid) HIV-1 POL;
- pruh 4: gp160 (HIV-1, obalový rekombinantní protein) HIV-1 ENV;
- pruh 5: p24 (HIV-1, jádrový rekombinantní protein) HIV-1 GAG;
- pruh 6: gp41 (skupina M a O) (HIV-1, obalové peptidy) HIV-1 ENV;
- kontrolní pruh: protein A [38].



Obr. 7 – Testovací kazeta Geenius™ HIV 1/2 Confirmatory Assay [38].

#### 4.4.3 Validace a interpretace výsledků

Test lze považovat za platný pouze v případě, že se v kontrolní oblasti objeví barevný proužek, a to bez ohledu na to, zda se objeví proužek v jiných oblastech. Pruhy v ostatních oblastech, ať už viditelné nebo vybledlé musejí být považovány za reaktivní [38].

V následující tabulce (Tab. 2) jsou popsána kritéria používaná pro konfirmační test Geenius™ HIV 1/2 Confirmatory Assay ke stanovení přítomnosti nebo nepřítomnosti protilátek proti HIV-1 a/nebo HIV-2 [38].

Tab. 2 - Kritéria interpretace HIV-1 a HIV-2 [38].

Kritéria interpretace HIV-1	Bio Rad kritéria
<b>Pozitivní</b>	Jakékoli 2 pruhy ze 4 HIV-1 testovacích čar s nejméně 1 ENV – gp160 (pruh 4) nebo gp41 (pruh 6)
<b>Negativní</b>	Bez pruhu
<b>Neurčitý</b>	1 ENV (pruh 4 nebo 6) 1 GAG (pruh 5) 1 POL (pruh 3) 1GAG a 1 POL (pruhy 5 a 3)
Kritéria interpretace HIV-2	Bio Rad kritéria
<b>Pozitivní</b>	Musejí být přítomny 2 HIV-2 pruhy: gp36 a gp140 (pruh 1 a 2)
<b>Negativní</b>	Bez pruhu
<b>Neurčitý</b>	1 ENV: gp36 (pruh 1) nebo gp140 (pruh 2) gp36 (pruh 1) samotný gp140 (pruh 2) samotný

## 4.5 Enzymová fluorescenční imunoanalýza (ELFA)

### 4.5.1 Popis metody

Současná diagnostika infekce HIV spočívá především v detekci sérových protilátek proti HIV s využitím metody ELISA. Mezi expozicí a výskytem prvních protilátek však existuje období v průměru 3 týdnů až 3 měsíců, kdy tyto protilátky nejsou detekovatelné. Současné studie ukázaly, že během tohoto období je u většiny lidí infikovaných virem HIV-1 přítomen antigen p24. Antigen p24 dokážeme pomocí metody ELFA ve vzorku analyzovat.

Metoda ELFA je podobná jako metoda ELISA, rozdíl je v použitém substrátu (molekula fluorochromu), který je enzymem štěpen na fluorescenční produkt. Vzniklé chemické změny jsou detekovány pomocí fotodiodového fluorimetru [32].



#### 4.5.2 Pracovní postup

V NRL pro HIV/AIDS je využívána metoda ELFA převážně k stanovení antigenu p24. Testování probíhá na přístroji mini Vidas a využívají se testovací sady VIDAS HIV DUO Ultra a VIDAS HIV P24 II od společnosti bioMerieux. Testovací sada VIDAS HIV DUO Ultra je založená na kombinované detekci celkových imunoglobulinů proti HIV-1 a HIV-2 a antigenu p24 HIV-1 v lidském séru nebo plasmě, sada VIDAS HIV P24 II ke stanovení samotného antigenu p24 viru HIV, k této sadě je dodávána také sada ke confirmaci VIDAS HIV P24 II Confirmation od stejného výrobce [39].

Princip testu VIDAS HIV DUO Ultra kombinuje 2 reakce enzymové immunoanalýza s konečnou detekcí fluorescence (ELFA). Činidla pro stanovení jsou připravena k použití a dodána v uzavřených reagenčních stripech. Celé stanovení probíhá v přístroji automaticky. Horní část komůrky s pevnou fází je potažena monoklonálními protilátkami proti p24 k detekci antigenu p24, spodní část pak umožňuje detekci protilátek proti HIV-1 a HIV-2: je potažena proteinem HIV-1 gp160 a syntetickými peptidy specifickými pro HIV-1 skupiny O a HIV-2 [39].

1. Během předběžné inkubace se vzorek, biotinem značená protilátka proti p24 ve stripu opakovaně vhánějí do a ven z reakční komůrky s pevnou fází.
2. Během inkubace dojde k lýze viru a uvolněný antigen p24 se naváže na monoklonální protilátku proti p24, kterou je potažen vnitřek komůrky a rozpozná se pomocí protilátky proti p24 značené biotinem.
3. Současně se protilátky proti HIV-1 a/nebo HIV-2 váží na gp160 a/nebo peptidy ve spodní části reakční komůrky. Komůrka se několikrát promyje.
4. Druhá inkubace s antigenem značeným biotinem ve stripu se provede pouze v dolní části reakční komůrky. Biotinem značený antigen se naváže na každou protilátku proti HIV, kterou je potažena dolní část reakční komůrky. Veškeré přebývajícím činidlo se odstraní promytím.

5. Třetí inkubace se provede se streptavidinem značeným alkalickou fosfatázou. Během tohoto kroku se streptavidin váže na protilátku proti p24 s biotinem, jestliže je přítomna v horní části reakční komůrky, a na antigen s biotinem, pokud je přítomen v dolní části komůrky. Přebývajícím činidlo se odstraní promytím.
6. Substrát se napřed inkubuje v dolní části reakční komůrky a změřeno se fluorescence při 450 nm. Intenzita fluorescence je přímo úměrná přítomnosti protilátky proti HIV ve vzorku.
7. Vzorek se poté inkubuje v celém objemu reakční komůrky a provede se druhé měření fluorescence.
8. Přístroj vypočítá intenzitu fluorescence v horní části reakční komůrky. Tato intenzita je přímo úměrná koncentraci antigenu p24 HIV-1 ve vzorku. Na konci stanovení přístroj výsledky automaticky vypočítá ve vztahu ke standardu a poté je vytiskne [39]; [40].

Testovací sada VIDAS HIV P24 II má zcela stejný princip provedení, pouze je v reakční komůrce navázána pouze monoklonálními protilátkami proti p24.

Konfirmační test VIDAS HIV P24 II Confirmation se používá k potvrzení přítomnosti antigenu p24 HIV-1 ve vzorcích lidského séra nebo plazmy, které poskytly pozitivní nebo opakovaně nejednoznačný výsledek s testem VIDAS HIV P24 II. Princip testu je založen na neutralizaci antigenu p24, který může být přítomen ve vzorku, kozím anti-p24 sérem. Po kontaktu s kozím anti-p24 sérem se vzorek testuje pomocí reagentie VIDAS HIV P24 II v porovnání se stejným vzorkem inkubovaným s negativním kozím sérem. Pro výpočet procenta neutralizace se používá vzorec. Pokud je hodnota procentuální míra neutralizace větší než 60 %, je přítomnost antigenu p24 potvrzena [41].

### 4.5.3 Interpretace výsledků

Výsledky jsou analyzovány automaticky počítačem. Fluorescenci přístroj odečte v optické kyvetě reagenčního stripu pro každý testovaný vzorek.

## 4.6 HIV RNA PCR

### 4.6.1 Popis metody

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda rychlé amplifikace vybraného úseku nukleové kyseliny. Amplifikovaný úsek je ohraničen tzv. primery, které si díky své komplementaritě přisedají právě ke koncům vybraného úseku. Od přisedlých primerů probíhá syntéza příslušných úseků. Samotnou syntézu provádí termostabilní DNA polymeráza, izolovaná nejčastěji z bakterie *Thermus aquaticus* (Taq polymeráza). Při reakci je využíváno cyklických změn teplot, které umožňují denaturaci nukleové kyseliny, přisedání primerů a následnou syntézu [42].

### 4.6.2 Pracovní postup

V NRL pro HIV/AIDS je využívána metoda HIV RNA PCR převážně ke stanovování virové nálože, ke confirmaci se tato metoda využívá jen ve specifických případech. Testování probíhá na přístroji Cobas Ampliprep ve spojení s qPCR Cobas TaqMan 48.

Test Cobas AmpliPrep je amplifikační test nukleové kyseliny pro kvantifikaci RNA viru lidského imunodeficitu typu HIV-1 v lidské plazmě. Test je založen na třech základních procesech [43].

1. příprava vzorku pro izolaci HIV-1 RNA;
2. reverzní transkripce cílové RNA pro vytvoření komplementární DNA (cDNA);
3. simultánní PCR amplifikace cílové cDNA a detekce rozštěpené, dvojité značené oligonukleotidové detekční sondy specifické pro cíl [43].

Cobas AmpliPrep umožňuje automatizovanou přípravu vzorku následovanou automatizovanou reverzní transkripcí, PCR amplifikací a detekcí cílové HIV-1 RNA a kvantifikačního standardu (QS) HIV-1. HIV-1 QS je jako druhá cílová sekvence přidávána o přesně známé koncentraci do každého testovaného vzorku. Jedná se o neinfekční RNA konstrukci, která obsahuje sekvence HIV s vazebnými oblastmi pro primery identickými s cílovou HIV-1 RNA a unikátní vazebné oblasti pro sondu, které umožní odlišení ampliconu HIV-1 QS od cílového HIV-1 ampliconu. Detekce amplifikované DNA se provádí pomocí cílově specifických a QS specifických, dvojitě značených oligonukleotidových sond, které umožňují nezávislou identifikaci ampliconu HIV-1 a HIV-1 QS. Analyzátor Cobas TaqMan 48 vypočítává koncentraci RNA HIV-1 v testovaných vzorcích srovnáním signálu HIV-1 se signálem HIV-1 QS u každého vzorku a kontroly [43].

#### **4.6.3 Interpretace výsledků**

Analyzátor Cobas TaqMan 48 stanovuje automaticky koncentrace RNA HIV-1 u vzorků a kontrol. Koncentrace HIV-1 RNA je vyjádřena v kopiích/ml nebo mezinárodních jednotkách (IU)/ml v závislosti na použitém definičním souboru testu. Konverzní faktor mezi kopiemi RNA HIV-1 /ml a HIV-1 v mezinárodních jednotkách (IU)/ml je 0,6 kopií/IU, za použití 1. mezinárodní normy WHO pro RNA HIV-1 pro technologie analýzy nukleových kyselin (NAT). Výsledky testovaných vzorků jsou interpretovány přístrojem možné výsledky jsou uvedeny v tabulce (Tab. 3) [43].

Tab. 3 – Možné výsledky analyzátoru Cobas TaqMan 48 <sup>[43]</sup>.

	Výsledek titru	Interpretace
Kopii/ml	Target Not Detected	Prahová hodnota (Ct) pro HIV-1 je nad hranicí testu nebo nebyla žádná Ct získána. Výsledky uvedeny: „HIV-1 RNA nedetekována“.
	< 2.00E+01 cp/ml	Vypočtená hodnota kopií/ml je pod detekčním limitem analýzy. Výsledek uveden: „HIV-1 RNA detekována, méně než 20 HIV-1 RNA kopií/ml“.
	≥ 2.00E+01 cp/ml ≤ 1.00E+07 cp/ml	Vypočtené výsledky větší než nebo rovny hodnotě 20 kopií/ml a menší než nebo rovny 1,00E+07 kopií/ml jsou v lineárním rozmezí analýzy.
	> 1.00E+07 cp/ml	Vypočtená hodnota kopií/ml je nad rozsahem analýzy. Výsledek uveden: „vyšší než 1,00E+07 HIV-1 RNA kopií/ml“.
Mezinárodní jednotky/ml	< 3.34E+01 IU/ml	Vypočtená hodnota IU/ml je pod detekční hranicí testu. Výsledek označen: „HIV-1 RNA detekována, méně než 33,4 HIV-1 RNA IU/ml“.
	≥ 3.34E+01 IU/ml ≤ 1.67E+07 IU/ml	Vypočtené výsledky větší než nebo rovny 33,4 IU/ml a menší než nebo rovny 1,67E+07 IU/ml jsou v lineárním rozmezí testu.
	> 1.67E+07 IU/ml	Vypočtená hodnota IU/ml leží nad rozmezím testu. Výsledek označen: „vyšší než 1,67E+07 HIV-1 RNA IU/ml“.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Výhody a nevýhody jednotlivých metod

#### 5.1.1 EIA

Výhodou EIA metod je cena jednotlivých testů. Dalším pozitivem je možnost automatizace, a tudíž zpracování velkého množství vzorků najednou.

Naopak nevýhoda spočívá ve velkém diagnostickém okně, toto se snaží eliminovat EIA metody 4. generace, které testují jak protilátky proti HIV viru, tak přítomnost antigenu p24 v séru nebo plasmě.

#### 5.1.2 Western blot

Výhodou metody western blot je velká pravděpodobnost, u pozitivních výsledků, že jsou ve vzorku přítomny protilátky anti-HIV, a tedy je pacient HIV pozitivní. Podle statistik bývají pouze méně než 2 % testů falešně pozitivní.

Nevýhodou testování metodou western blot je možnost prokázání pouze infekce způsobené virem HIV-1, genom viru HIV-2 je značně odlišný, a tudíž je nutné před samotným použitím testovací sady vyloučit přítomnost viru HIV-2. Pokud chceme konfirmovat pomocí western blotu infekci způsobenou virem HIV-2, musíme využít testovací sadu k tomuto účelu určenou, kdy na stripu budou navázány proteiny a glykoproteiny viru HIV-2.

Další nevýhodou metody western blot je nutnost přítomnosti již vytvořených anti-HIV protilátek proti příslušným proteinům viru. Tyto protilátky se vytváří individuálně v rozmezí od 3 týdnů až do 3 měsíců po nákaze. V akutním stádiu infekce, kdy nejsou ještě protilátky vytvořeny, jsou konfirmační testy falešně negativní.

### 5.1.3 Imunochromatografické metody

Výhody této metody spočívají v rychlém vyšetření (test trvá přibližně 35 minut), zda se jedná o infekci virem HIV-1 nebo HIV-2. Testování lze realizovat z kapilární krve, plné krve, séra nebo plazmy. Výhodou je také snadná manipulace s testovací sadou.

Hlavní nevýhodou tohoto testování je, stejně jako u metody western blot, falešná negativita u pacientů, kteří byli testováni v akutní fázi infekce. V akutní fázi ještě nejsou vytvořeny protilátky proti proteinům viru HIV, tyto anti-HIV protilátky se vytvářejí v období po 3 týdnech až 3 měsících po expozici. Další nevýhodou je vizuální odečet, který může obnášet určitou variabilitu při konečném závěru mezi dvěma různými posuzovateli nebo dvěma různými testy. Metoda má také, oproti metodě western blot nevýhodu v menším počtu navázaných proteinů viru HIV na kazetě, a tudíž nižší specifčnost.

### 5.1.4 ELFA

Výhodou této metody je automatizace, která zabraňuje chybě způsobené lidským faktorem. Další výhodou je možnost zachytu HIV pozitivních jedinců v období, kdy by je běžné nepřímé serologické testy na HIV neodhalily.

Nevýhodou je fakt, že antigen p24 viru HIV je v krvi v detekovatelném množství přítomen převážně v období akutní infekce, tedy přibližně od druhého týdne po nákaze až do čtvrtého týdne. Pokud je test proveden později, vykazuje test falešnou negativitu. Z tohoto důvodu je nutná i následná confirmace, pokud je vzorek pozitivní, jiné confirmační metody na principu nepřímé diagnostiky by nemohly pozitivitu potvrdit.

### 5.1.5 HIV RNA PCR

Výhodou této metody je, že dokáže HIV virus zachytit nejdříve ze všech doposud jmenovaných metod, udává se už 10 den po expozici je možné virus HIV v plasmě detekovat.

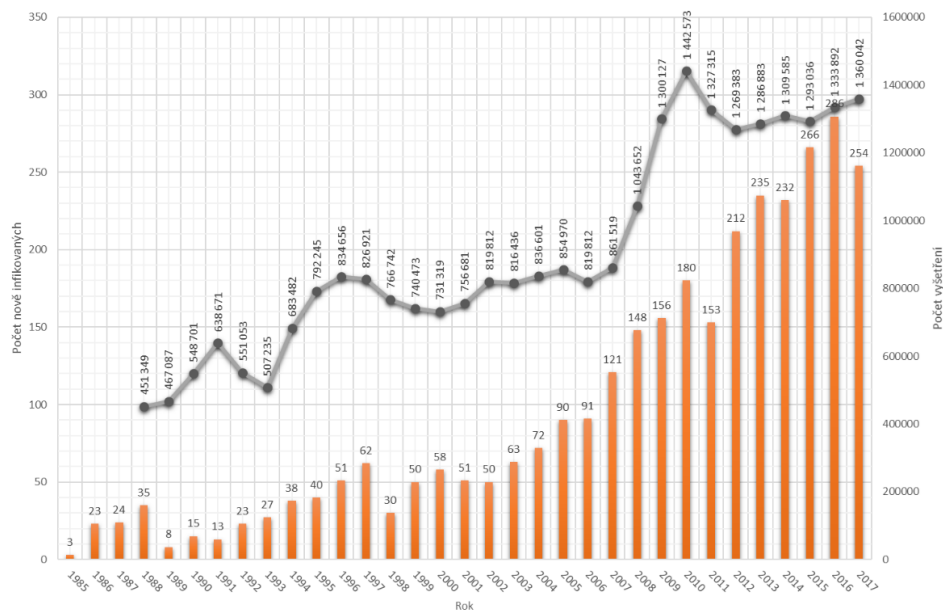
Metoda se využívá, hlavně k určování klinické terapie pacientů infikovaných virem HIV. Pomocí testu je možné posuzovat pacientovu prognózu stanovením výchozí hladiny HIV RNA nebo sledovat účinky antiretrovirové terapie stanovením změn hladin HIV RNA v plasmě v průběhu antiretrovirové terapie. Tyto testy povětšinou nejsou určeny k plošnému vyšetřování krve či krevních derivátů na přítomnost HIV, ani jako diagnostický test k potvrzení infekce virem HIV. Důvodem je cena, která je mnohonásobně vyšší než u ostatních běžných testů. Jsou zaváděny nové metody tzv. NAT PCR testy, u kterých je detekce nukleové kyseliny prováděna v poolech 96 vzorků (pool = směsný vzorek z příslušného počtu primárních vzorků). Toto testování pak vyjde levněji než testování každého vzorku zvlášť, prozatím se využívá toto NAT testování v ČR pouze v transfuzní službě [44].

## 5.2 Epidemiologická situace

### 5.2.1 Počty vyšetření a počty HIV+ osob v České republice

Obr. 8 znázorňuje epidemiologickou situaci v České republice od začátku testování v roce 1985 až po rok 2017. Počty vyšetření mají stále vzestupnou tendenci, počty nově infikovaných osob se již šestým rokem drží nad dvěma sty.

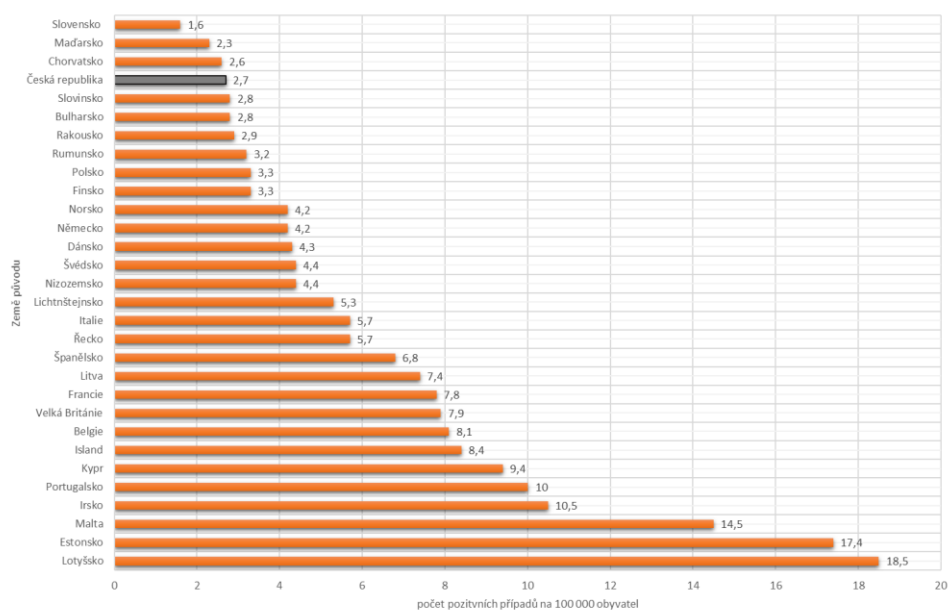




Obr. 8 - Počet vyšetření a počet HIV+ v ČR v jednotlivých letech [45].

### 5.2.2 ČR v porovnání se světem

Na Obr. 9 je porovnána epidemilogická situace nově infikovaných osob v České republice s ostatními státy Evropy za rok 2016. Z důvodů porovnání zemí s rozdílnými počty obyvatel, jsou čísla přepočítána na počet pozitivních případů na 100 000 obyvatel.

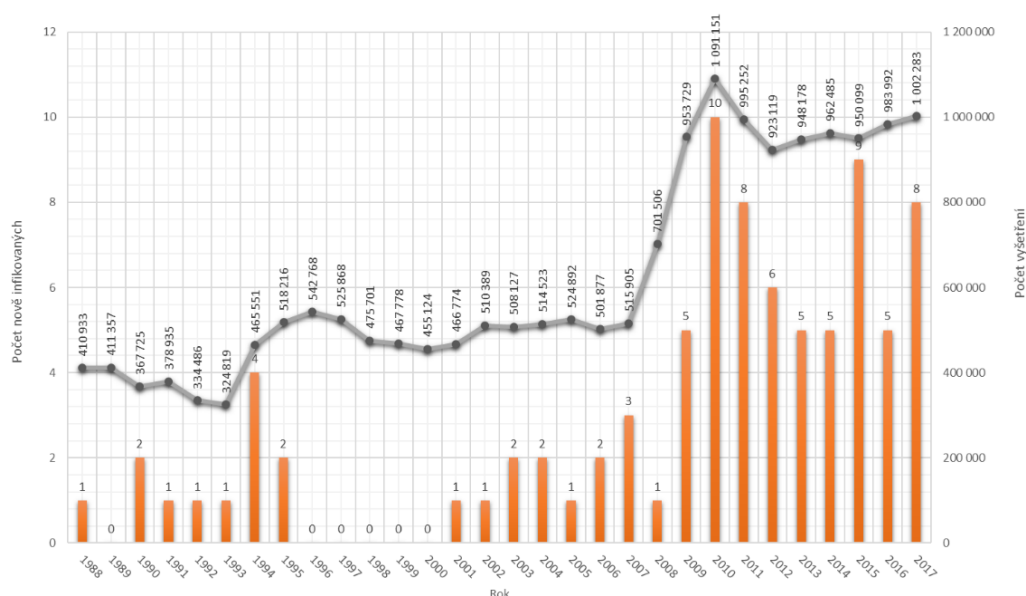


Obr. 9 - Nově diagnostikovaní HIV+ pacienti podle země původu za rok 2016

(počet pozitivních případů na 100 000 obyvatel) [46].

### 5.2.3 Testování krevních vzorků

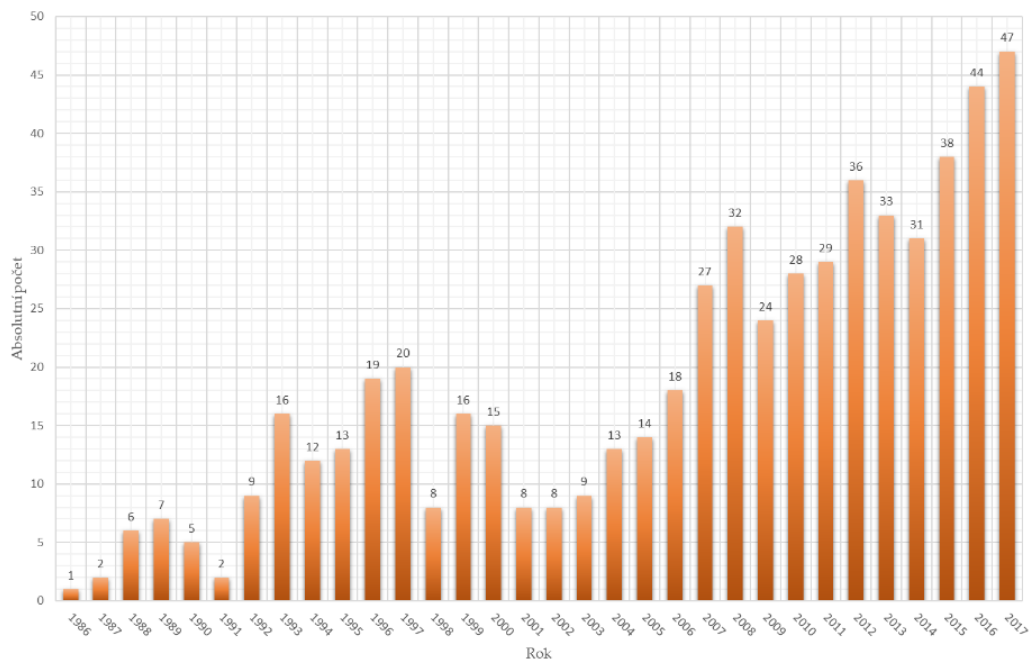
Na Obr. 10 je znázorněno testování krevních vzorků, které je jedním ze základních povinných screeningových vyšetření v České republice. V roce 2017 bylo celkem provedeno 1 002 283 testů u dárců krve a plasmy. Celkově představují odběry na odděleních transfuzní služby a v plazmaferetických centrech 73,7 % všech provedených testů na přítomnost HIV viru. Bylo při nich zjištěno 8 HIV pozitivních dárců. Kumulativně bylo při darování krve nebo plazmy od roku 1988 odhaleno 86 HIV pozitivních osob.



Obr. 10 - Testování krevních vzorků v transfuzní službě [45].

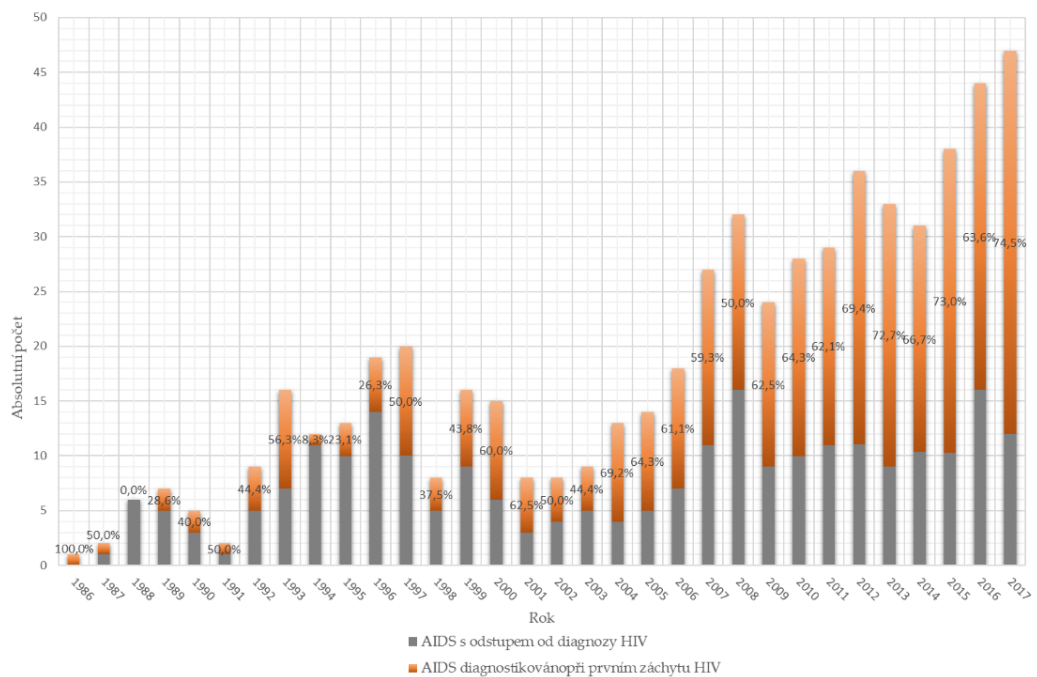
### 5.2.4 Nové případy AIDS

Z Obr. 11 je patrné, že počty nově zjištěných onemocnění AIDS stále narůstají. Za rok 2017 byl zaznamenán nejvyšší počet nově vzniklých onemocnění v porovnání s předchozími lety.



Obr. 11 - Počet nových případů AIDS v jednotlivých letech [45].

Na Obr. 12 je zobrazeno jaké procento nových případů AIDS onemocnění je u pacientů s HIV pozitivitou prokázáno nově, tedy při prvním pozitivním testování na HIV.



Obr. 12 - Stadium AIDS – podíl pozdě zachycených případů [47]; [48].

## 6 DISKUZE





Během posledních dvou desetiletí došlo k výraznému pokroku v porozumění interakce viru HIV s hostitelem a klinické léčbě infekce způsobené tímto virem. Nové poznatky se odráží také ve zlepšení testů používaných k diagnostice viru a sledování průběhu onemocnění AIDS. Jak je uvedeno ve zdroji [49] z roku 2008, především rozvoj molekulárních testů značně změnil tradiční přístup k virové identifikaci a charakterizaci. Do této doby, byly testy založené především na sérologických metodách. Molekulární metody sebou přináší nové pojetí testování, založené na detekci a kvantifikaci genových sekvencí viru HIV. I přes výhody, které sebou molekulární metody přináší nelze údaje z článku ani po deseti letech vyloučit a je stále nutné využívat serologické enzymatické imunoanalytické metody (EIA) jako stěžejní metodu pro testování HIV. Doposud není vývoj molekulárních technik na takové úrovni, abychom je mohly využívat jako hlavní metodu pro testování. Důvodem je stále ještě vyšší cena testování a také občasné problémy s přesností testů. Dnes se tedy v klinických laboratořích v České republice využívají stále ještě serologické metody a molekulární metody se využívají převážně pro stanovení virové nálože u již diagnostikovaných pacientů, jak je uvedeno ve zdroji [8] a nově se také zavádí v transfuzní službě u testování krevních vzorků.

Serologické imunoenzymatické techniky – EIA, které jsou nejen v České republice, ale také celosvětově nejrozšířenějšími screeningovými testy viru HIV si drží již od počátku testování viru své neochvějné místo. EIA testy prošly postupem let spoustou modifikací za účelem zvýšit účinnost testů (Tab. 4 – ). EIA metod 1. generace, které byly využívány jako první pro rutinní testování protilátek proti HIV již od poloviny osmdesátých let a fungovaly na principu lyzátů HIV-1, dokázaly detekovat pouze přítomnost protilátek proti HIV a nebyly dostatečně specifické. Následovalo nahrazení nativních virových proteinů rekombinantními a syntetickými peptidy. Tyto modifikace vedly ke zkrácení diagnostického okna a zvýšení specifity. Neustálá potřeba zlepšovat screeningové a diagnostické

stanovení pro HIV vedla k vývoji 4. generace, tzv. duálním testům. U těchto testů došlo ke spojení detekce antigenu p24 s detekcí protilátek proti HIV v jednom testu. Zavedením testování antigenu p24 společně s anti-HIV protilátkami se značně zkrátilo diagnostické okno (období, kdy nelze virus stanovit, přestože virus je již přítomen) na cca 2 týdny po expozici. Důvodem tak velkého rozšíření a využívání metod EIA je skloubení příznivé ceny vyšetření, citlivosti a specifčnosti metody, rychlosti samotného testu a v neposlední řadě také možnosti automatizace. Výhodou je také velká konkurence výrobců na trhu EIA testovacích sad, která vede k dostupnosti různých kombinovaných testů a snahu výrobců své testy neustále zdokonalovat, jak je uvedeno ve zdrojích [49] a [50].

Zavedení automatických analyzátorů fungujících na principu EIA metod, umožnilo více laboratořím zařadit do svého seznamu vyšetření, také testování viru HIV. Automatizované testování navýšilo ještě více specifitu a citlivosti vyšetření včetně schopnosti detekovat antigen HIV i několika podtypů.

Tab. 4 – Obecný vývoj imunologických testů HIV od roku 1985 [50].

Generace	1.	2.	3.	4.
Antigen				
Vzorek				
Konjugát				
Signál				
Antigen	Lyzát		Rekombinantní a syntetický	
Specifita	95-98 %	> 99 %	> 99,5 %	99,5%
Citlivost	99%	> 99,5 %	> 99,5 %	> 99,8 %
Diagnostické okno	8 - 10 týdnů	4 - 6 týdnů	2 - 3 týdny	2 týdny
Třída detekce imunoglobulinů	IgG	IgG	Vše	Vše
Přibližný rok prvního použití	1985	1987	1991	1997

EIA metody se nevyužívají pouze k běžnému screeningu v laboratořích s oprávněním HIV testovat, ale také jako tzv. rychlé testy a konfirmační testy v NRL pro HIV/AIDS. Rychlé testy, jsou využívány především ke screeningu v místech, kde není možné provést odběr v laboratoři nebo není žádoucí, aby byl výsledek zjištěn

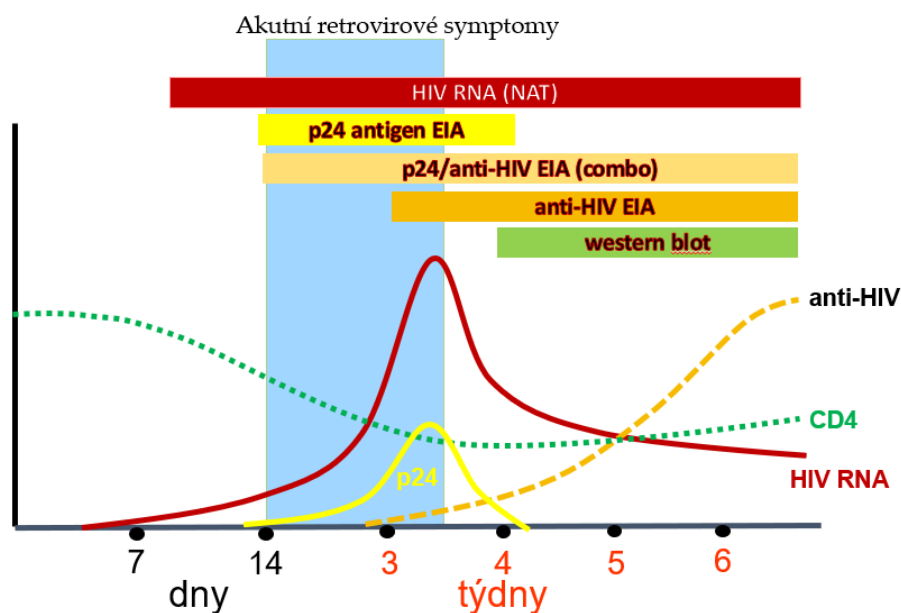
co možná nejrychleji. Takovéto testy dokáží zjistit výsledek do 20 minut. Většina takovýchto testů je založena na principu EIA metod 4. nebo 3. generace a jsou speciálně upravené na použití mimo laboratoř.

Rychlé testy bývají využívány také pro domácí testování. V České republice však doposud není žádná testovací sada k domácímu použití certifikována. Například ve Velké Británii je povoleno domácí testování od 6. dubna 2014, viz zdroj [51]. Výhodou těchto testů je, že testovaná osoba získá výsledek, pokud se jedná o test Ab/Ag do 20 minut, u testů, které testují pouze Ab i do dvou minut, jak je uvedeno ve zdroji [52]. Na českém trhu je v současnosti dostupný pouze lékařskou společností České republiky necertifikovaný domácí test OraQuick (v USA certifikovaný pro domácí použití již od roku 2012). Tato testovací sada umožňuje testování ze slin, kapky plné krve i plasmy pacienta. U kapky plné krve a plasmy deklaruje výrobce 100 % specifickost u testů ze slin pak 99,8 %, zdroj [53]. Domácí testování však sebou nese i přede dobrou specifickost a citlivost testů spoustu negativ, např. nesnadnou manipulaci s testem, složité odečtení výsledků, nepřítomnost osoby, která by v případě reaktivního výsledku poskytla poradenství. S postupem domácího testování v zahraničí, se bude pravděpodobně sledovat proces domácího testování HIV v těchto zemích a pokud se neobjeví jakékoliv komplikace, můžeme očekávat, zavedení certifikovaných domácích testů také v České republice.

Alternativou těchto testů, jsou tzv. poštovní testy, které jsou využívány v zahraničí (Velká Británie, Německo atd.) [54]. Testovaná osoba si sama odebere vzorek, nejčastěji krev z prstu nebo sliny, a poté tento test zašle do laboratoře k otestování. Výsledky testu jsou pak zaslány textovou zprávou nebo telefonátem od zdravotníka. Tyto testy však neposkytují informaci o výsledku ihned, což je pro testovanou osobu, která volí takovýto typ mimolaboratorního vyšetření většinou klíčové.

Všechny HIV reaktivní vzorky v České republice, ať už z klinických laboratoří, rychlých testů a dalších musí být zaslány vždy ke confirmaci do NRL pro HIV/AIDS v Praze. Oproti například Německu, které vyžaduje nový odběr vzorků z důvodů možné záměny, u nás referenční laboratoř nevyžaduje nový odběr po reaktivním screeningovém testu, ale stačí zaslat prvotní odběr, pokud je tedy materiálu dost na provedení požadovaných confirmačních vyšetření. K jednotlivým vzorkům se přistupuje individuálně a není dán zcela přesný postup confirmace reaktivního vzorku.

Hlavním confirmačním testem je metoda western blot. Confirmace reaktivních vzorků je nutná z důvodů častých falešně pozitivních výsledků. Falešně pozitivní výsledky bývají často způsobené, vysokou citlivostí EIA testů. Z těchto důvodů je nutné použít další testovací metodu a tou je nejčastěji Western blot. Tato metoda se ke confirmaci využívá po celém světě a nepsaným pravidlem je, že pokud je western blot pozitivní lze pacienta označit za HIV pozitivního. Postupem let se metoda inovovala například použitím poloautomatů (v referenční laboratoři využívají poloautomat Dynablot), které znatelně ulehčují práci laborantům a tím i předchází možnosti vzniku chyb způsobených lidským faktorem. Nevýhodou této metody je nutnost přítomnosti anti-HIV protilátek, které se v infikovaném organismu vytváří v období od tří týdnů až tří měsíců, přehledně uvedeno na obrázku 17 (Obr. 13). Diagnostické okno je i přes velkou citlivost a přesnost testu značně velké a například pacienti v akutní fázi HIV infekce, s ještě dostatečně nevytvořenými protilátkami proti HIV mohou mít neurčité nebo falešně negativní testy. Z těchto důvodů se provádí ještě vyšetření a confirmace pouze samotného antigenu p24 metodou ELFA, který je, jak je z obrázku 17 patrné, přítomný již v akutní fázi HIV infekce.



Obr. 13 – Dynamika markerů a záchytnost testů [30].

Důležité je také rozlišení, zda se jedná o infekci virem HIV-1 nebo HIV-2. V naší zeměpisné oblasti je značná převaha infekcí virem HIV-1, velice ojediněle se vyskytuje infekce virem HIV-2, který má své působiště především na území Afriky. Na toto testování se využívá imunochromatografická metoda, která díky navázaným antigenním strukturám obou typů virů, dokáže rychle rozlišit o který vir se jedná.

Jak je patrné z Obr. 13, nejkratší diagnostické okno má stanovení HIV RNA molekulárními metodami. Tyto metody jsou založené na amplifikaci virové RNA a následném analytickém stanovení jeho množství. Výhodou těchto testů je, že se stanovuje přímo vir HIV v krvi, tedy se nemusí čekat na vytvoření protilátek proti HIV, ale pouze na zmnožení viru v krvi nad hodnotu 20 cp/ml, kterou jsou již dnešní analyzátoři schopni identifikovat. Metoda se využívá především ke stanovení virové nálože, u již diagnostikovaných pacientů, kteří podstupují terapii antiretrovirotiky. Modifikovaná metoda se začala využívat v diagnostice dárců krevních derivátů, kde je nutné znát jistě, že je darovaná krev nebo jiný derivát neinfekční. Jedná se o tzv. NAT testování, s rozdílem od běžného PCR se testuje



v tzv. poolech, kdy je smícháno více vzorků různých dárců a otestují se najednou, pokud je jeden ze vzorků v poolu infekční je poté nutné jednotlivé vzorky otestovat znovu. Tato modifikace umožnila částečně zlevnit vyšetření, ale zvýšila nepřesnost a chybovost metody. NAT testování se využívá nejen ke stanovení HIV, ale také hepatitid B a C, které by mohly vážně ohrozit příjemce daného krevního derivátu.

V roce 2010 bylo zavedeno v TTO FN Brno NAT testování za účelem zvýšit bezpečnost transfuzních přípravků. V tomtéž roce bylo zaznamenán nejvyšší počet testovaných dárců krevních vzorků (Obr. 10). Od září roku 2013 probíhá NAT testování také v ÚVN Praha, zde bylo toto testování zavedeno jednak k zvýšení bezpečnosti, ale také z důvodů harmonizace transfuzních přípravků v rámci spojeneckých zemí NATO. Pokud chce ČR napomáhat ve vojenských operacích poskytováním transfuzních přípravků, musí být tyto přípravky dle NATO otestovány právě touto metodou [44].

Od roku 1988 do konce roku 2017 bylo otestováno přes 18 milionů dárců krevních vzorků, z nichž bylo u 86 dárcům zjištěna HIV pozitivita. Celkově představují odběry na odděleních transfuzní služby a v plazmaferetických centrech 73,7 % všech provedených testů na přítomnost HIV viru [47]; [48]. Stálou diskuzí je povinné zavedení NAT testování ve všech transfuzních stanicích, po celé České republice. Po událostech z předchozích let, kdy byla podána infikována transfuze hepatitidou C se zvýšil tlak na povinné zavedení testování krevních vzorků metodami NAT. Pravděpodobné bude tato povinnost ukotvena v zákoně během následujících několika let.

Žádná metoda, která byla doposud používaná na testování přítomnosti HIV viru v organismu, nedokáže stoprocentně určit, zdá osoba, je, či není zcela jistě HIV pozitivní. Všechny dodnes využívané metody sebou nesou určitou chybovost v podobě falešně negativních nebo naopak pozitivních výsledků. Řešení problematiky tak nadále zůstává vyšetřovat screeningové vzorky co nejcitlivějšími

metodami, dnes nejčastěji EIA testy 4. generace, které sice díky své vysoké citlivosti produkují značné procento falešně pozitivních výsledků, ale jsou komplexně zatím nejvýhodnější jak po stránce diagnostické, tak ekonomické. Z reaktivních vzorků se poté širokou sítí metod využívaných ke confirmaci vyloučí vzorky falešně pozitivní. U EIA testů 4. generace, i přes stále dokonalejší testovací sady hrozí riziko nezachycení HIV-pozitivního pacienta přibližně po 14 dnech po expozici virem.

Zmenšení diagnostického okna (o cca 5 dní) přináší molekulární metody. Tyto metody jsou však stále finančně nákladnější než serologické testy, a proto jsou k primárnímu screeningu (s výjimkou transfuzní služby kde je využíváno také NAT testování), používány stále metody serologické. Budoucnost testování HIV viru v lidském organismu se, ale pravděpodobně bude ubírat právě směrem molekulárních metod a jejich různých modifikací.

Epidemiologická situace v České republice, je i přes stále narůstající počty nově diagnostikovaných HIV pozitivních osob (Obr. 8), v porovnání s ostatními státy Evropy řazena mezi země s nižší incidencí HIV na 100 000 obyvatel (Obr. 9). Od počátku testování až do roku 2016 byl pozorován nárůst HIV pozitivních osob, loňský rok však zaznamenal jisté snížení a můžeme doufat, že tato tendence bude nadále pokračovat.

Celosvětově je snaha o docílení mety 90-90-90, který by měl napomoci ukončit epidemii HIV/AIDS, kdy 90 % procent HIV pozitivních osob by mělo být seznámeno se svým HIV statutem, 90 % těchto identifikovaných HIV osob bylo léčeno účinnou antiretrovirovou léčbou a je snaha, aby z těchto léčených osob, bylo 90 % léčeno účinně. Podle předpokladu společnosti UNAIDS bylo v roce 2016 osob žijících s HIV bez znalosti jejich HIV statusu v ČR přibližně 25 %, tedy přibližně 700 lidí. Z HIV pozitivních osob, kteří znají svůj HIV pozitivní status podstupuje 52 % antiretrovirovou terapii a u poloviny z nich je tato léčba úspěšná [55].

Současným problémem je také pozdní záchyt onemocnění. Za rok 2017 bylo zaznamenáno 47 nových případů AIDS (Obr. 11). Z tohoto počtu pouze 12 osob již bylo klasifikováno HIV pozitivním statusem již dříve a do stadia AIDS teprve dospělo, 35 osob se statusem AIDS bylo nově identifikovaných, tedy při prvním záchytu byly již ve stadiu AIDS (Obr. 12). Tento problém souvisí převážně s neinformovaností osob, ale není moc možností, jak tento narůstající fenomén zastavit.

## 7 ZÁVĚR

Tato Bakalářská práce je zaměřena na moderní metody, kterými se v současnosti diagnostikuje virus HIV v lidském organismu. V práci jsem se snažila podat ucelený přehled přímých i nepřímých diagnostických metod. Popsala jsem pět základních metod, které jsou v České republice používány, konkrétně v NRL pro HIV/AIDS. Techniky se využívají jak pro běžný screening, tak i pro potvrzení reaktivních vzorků.

Popsala jsem metody EIA 4. generace, které se využívají pro screening ale také ke potvrzení. Dále metodu western blot, která je určena výhradně ke potvrzení. Rovněž imunochromatografickou metodu, která je využívána především k odlišení druhů viru HIV-1 a HIV-2. Metody ELFA slouží ke stanovení samotného antigenu p24 a testování HIV RNA pomocí PCR. U každé metody jsem uvedla, jaké testovací sady se využívají právě v NRL pro HIV/AIDS a jejich principy.

Výsledky uvádí výhody a nevýhody jednotlivých metod a přehled epidemiologické situace v České republice. Porovnání incidence na 100 000 obyvatel s ostatními státy Evropy a screeningové testování krevních vzorků, které představují praktickou aplikaci metod používaných metod v klinických laboratořích a Národní referenční laboratoři.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ab	protilátka (antibody)
Ag	antigen
AIDS	syndrom získaného imunodeficitu (acquired immunodeficiency syndrome)
ART	antiretrovirová terapie
AZT	azidothymidin
cART	kombinovaná antiretrovirová terapie
CCR5	chemokinový koreceptory 5
CD4 T-lymfocyty	typ bílých krvinek nejčastěji napadený HIV
CD8 T-lymfocyty	cytotoxické bílé krvinky
cDNA	DNA syntetizovaná podle RNA (complementary DNA)
CMIA	chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročásticích (chemiluminescent microparticle immunoassay)
CNS	centrální nervová soustava
CTL	cytotoxické lymfocyty
CXCR4	chemokinový koreceptory 4 (fusin)
DC	dendritické buňky (dendritic cells)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
EI	inhibitory vstupu (entry inhibitors)
EIA	enzymová imunoanalýza (enzyme immunoassay)
ELFA	enzyme-linked fluorescent assay
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ENV	gen viru HIV kódující tvorbu virových obalů (envelope)
FDA	úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
FDC	folikulární dendritické buňky

FI	inhibitory fúze (fusion inhibitors)
GAG	gen viru HIV kódující tvorbu proteinů matrix, kapsid a nukleokapsidy (group antigen)
gp	glykoprotein
HAART	vysoce aktivní antiretrovirová terapie (highly active antiretroviral therapy)
HIV	virus lidského imunodeficitu (human immunodeficiency virus)
HIV+	HIV pozitivita, HIV-pozitivní
HLA	lidské leukocitární antigeny (human immunodeficiency virus)
HR1	doménu virového povrchového glykoproteinu gp41 viru HIV
HR2	doménu virového povrchového glykoproteinu gp41 viru HIV
HRP	horse radish peroxidase
HTLV III	lidský T-lymfotropní virus typ III
I	integráza
ICAM	intercelulární adhezivní molekula
IFNg	Interferon gamma
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
INSTI	inhibitor HIV-1 integrázy (integrase stand transfer inhibitor)
IU	mezinárodní jednotka (international unit)
kDa	kilodalton (jednotka molekulové hmotnosti)
KIR	killer cell immunoglobulin-like receptor
LC	Langerhansovy buňky
LAV	lymfadenopatický vir

LTNP	dlouhodobí nonprogresoři (long-term nonprogressors)
LTR	dlouhá koncová repetice (long terminal repeat)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MIP	macrophage inflammatory protein (skupina chemokinů)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (messenger RNA)
MZ	ministerstvo zdravotnictví
NAT	analýza nukleové kyseliny (nucleic acid testing)
NK	cytotoxické buňky (natural killers)
NNRTI	nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors)
NRL	národní referenční laboratoř
NRTI	nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (nucleoside reverse transcriptase inhibitors)
OOVZ	orgán ochrany veřejného zdraví
P	proteáza
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PI	inhibitory proteázy
POL	gen viru HIV kódující enzymy viru (polymeráza)
QS	kvantifikační standart
Rantes	druh chemokinů (regulated upon activation)
RNA	ribonukleová kyselina
RT	reverzní transkriptáza
SIV	virus opičí imunodeficiencie (stromal cell-derived factor)
TCR	T-buněčný receptor (T cell receptor)
TNF	tumor nekrotizující faktor (tumor necrosis factor)
WHO	Světová zdravotnická organizace

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Fact sheet - Latest statistics on the status of the AIDS epidemic: GLOBAL HIV STATISTICS. In: *UNAIDS* [online]. Švýcarsko: UNAIDS, 2018 [cit. 2018-05-02]. Dostupné z: <http://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>
- [2] *Tisková zpráva Národní referenční laboratoře pro HIV/AIDS: Trendy vývoje a výskyt HIV/AIDS v ČR v roce 2017*. Praha, 2018. Dostupné také z: [http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/HIV\\_AIDS/rocní\\_zpravy/2017/Tiskova\\_zprava\\_NRL\\_pro\\_HIV\\_AIDS\\_2017.pdf](http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/HIV_AIDS/rocní_zpravy/2017/Tiskova_zprava_NRL_pro_HIV_AIDS_2017.pdf)
- [3] ČERNÝ, Rudolf a Ladislav MACHALA. *Neurologické komplikace HIV/AIDS*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2007. ISBN 978-80-246-1222-5.
- [4] CELER, Vladimír. *Obecná virologie*. 1. vyd. Hradec Králové: Nucleus HK, 2010. ISBN 978-80-87009-70-3.
- [5] SALAVEC, M., V. BOŠTÍKOVÁ a P. BOŠTÍK. HIV infekce – historie, patogeneze, klinické manifestace. *Česko-slovenská dermatologie*. 2011, **86**(2), 67-81.
- [6] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Dotisk r. 2006. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902896-6-5.
- [7] ŠEJDA, Jan. *Prevence, léčba a další aspekty nákazy HIV/ AIDS*. 1. Praha: Galén, 1993. ISBN 80-85824-02-7.



- [8] JILICH, David a Veronika KULÍŘOVÁ. *HIV infekce - Současné trendy v diagnostice, léčbě a ošetrovatelství*. 1. Praha: Mladá fronta, 2014. ISBN 978-80-204-3325-1.
- [9] BENEŠ, Jiří. *Infekční lékařství*. 1. vyd. Praha: Galén, 2009. ISBN 978-80-7262-644-1.
- [10] GAO, Feng, Elizabeth BAILES, David ROBERTSON et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature*. 1999, **397**(6718), 436-441. DOI: 10.1038/17130. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/17130>
- [11] KEELE, B. Chimpanzee Reservoirs of Pandemic and Nonpandemic HIV-1. *Science*. 2006, **313**(5786), 523-526. DOI: 10.1126/science.1126531. ISSN 0036-8075. Dostupné také z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1126531>
- [12] DOMS, Robert a Jacqueline REEVES. Human immunodeficiency virus type 2. *Journal of General Virology*. 2002, **83**(6), 1253-1265. DOI: 10.1099/0022-1317-83-6-1253. ISSN 0022-1317. Dostupné také z: <http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-83-6-1253>
- [13] SHARP, P., E. BAILES, R. CHAUDHURI, C. RODENBURG, M. SANTIAGO a B. HAHN. *The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when?*. b.r. DOI: 10.1098/rstb.2001.0863. Dostupné také z: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2001.0863>

- [14] PROVAZNÍK, Kamil. *Manuál prevence v lékařské praxi*. 1. vyd. Praha: Státní zdravotní ústav, 1996. ISBN 80-716-8400-7.
- [15] SVOBODA, Jaroslav. *Imunologie v klinické praxi I: HIV onemocnění a AIDS jako modely postižení imunitního systému*. 1. Praha: Marvil, 1996. ISBN 379.00.
- [16] Pathogenesis of HIV-1 Infection. *Hivbook.com* [online]. Hamburg: Medizin Fokus Verlag, 2011 [cit. 2017-11-13]. Dostupné z: <https://hivbook.com/category/part-1-the-basics/3-pathogenesis-of-hiv-1-infection/>
- [17] Způsoby přenosu. In: *HIV prevence: jak se chránit proti HIV* [online]. Praha: Česká společnost AIDS pomoc, 2014 [cit. 2017-11-03]. Dostupné z: <http://www.hiv-prevence.cz/zpusoby-prenosu.html>
- [18] CAMMACK, Richard, ed. *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology*. Rev. ed. New York: Oxford University Press, 2011. ISBN 978-0-19-852917-0.
- [19] O'GORMAN, Maurice a Albert DONNENBERG. *Handbook of human immunology*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. ISBN 08-493-1984-6.
- [20] HÁJEK, Marcel. *HIV/AIDS v chirurgických oborech*. 1. vyd. Praha: Grada, 2004. Malá monografie. ISBN 80-247-0857-4.
- [21] BARTŮŇKOVÁ, Jiřina, Anna ŠEDIVÁ a Aleš JANDA. *Imunodeficiencie*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-1980-1.
- [22] ČERNÝ, Jan. Virus HIV a jeho vstup do buňky. *Vesmír*. 2004, **83**(1), 41.

- [23] MIYAUCHI, Kosuke, Yuri KIM a Olga LATINOVIC. HIV Enters Cells via Endocytosis and Dynamin-Dependent Fusion with Endosomes. *Cell* [online]. 2009, **137**(3), 402-404 [cit. 2017-12-02]. ISSN 0092-8674. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867409002682?via%3Dihub>
- [24] IZQUIERDO-USEROS, Nuria. HIV and Mature Dendritic Cells: Trojan Exosomes Riding the Trojan Horse?. In: *PLOS: Pathogens* [online]. b.r., s. 9 [cit. 2018-01-30]. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000740 ER. ISBN 10.1371/journal.ppat.1000740 ER.
- [25] STAŇKOVÁ, CSc,. Novinky v antiretrovirové terapii HIV/AIDS infekce. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2008, **10**(11), 498-501 [cit. 2018-02-16]. ISSN ISSN - 1803-5256. Dostupné z: [https://www.internimedicina.cz/artkey/int-200811-0003\\_Novinky\\_v\\_antiretrovirove\\_terapii\\_HIV\\_AIDS\\_infekce.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3DNOVINKY%2BV%2BANTIRETROVIROV%25C9%2BTERAPII%2BHIV%252FAIDS%2BINFEKCE%26sfrom%3D0%26spage%3D30](https://www.internimedicina.cz/artkey/int-200811-0003_Novinky_v_antiretrovirove_terapii_HIV_AIDS_infekce.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3DNOVINKY%2BV%2BANTIRETROVIROV%25C9%2BTERAPII%2BHIV%252FAIDS%2BINFEKCE%26sfrom%3D0%26spage%3D30)
- [26] BERKHOUT, Ben, Dirk EGGINK a Rogier SANDERS. Is there a future for antiviral fusion inhibitors?. *Current Opinion in Virology* [online]. 2012, **2**(1), 50-59 [cit. 2018-02-19]. DOI: 10.1016/j.coviro.2012.01.002. ISSN 18796257. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1879625712000041>
- [27] LIEBERMAN-BLUM, S., H. FUNG a J.C. BANDRES. Maraviroc: A CCR5-Receptor Antagonist for the Treatment of HIV-1 Infection. *Clinical Therapeutics* [online]. 2008, **30**(7), 1228-1250 [cit. 2018-02-19]. DOI: 18691983.

Dostupné z: [http://www.clinicaltherapeutics.com/article/S0149-2918\(08\)80048-3/pdf](http://www.clinicaltherapeutics.com/article/S0149-2918(08)80048-3/pdf)

- [28] SNOPKOVÁ, S., H. ROZSYPAL, V. ASTER et al. *Doporučený postup péče o dospělé infikované HIV a postexpoziční profylaxe infekce HIV: Doporučený postup Společnosti infekčního lékařství České lékařské společnosti J. E. Purkyně*. 1. Praha: Terapeutická skupina Národní komise pro řešení problematiky HIV/AIDS v ČR, 2016. Dostupné také z: <http://www.infekce.cz/DoporART16t.htm>
- [29] ČESKÁ REPUBLIKA. Zákon o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů. In: *Sbírka zákonů*. Praha: Tiskárna Ministerstva vnitra, 2001, ročník 2000, částka 74, č.258.
- [30] NĚMEČEK, Vratislav. *HIV/AIDS: NRL pro HIV/AIDS Státní zdravotní ústav*. Praha, 2016.
- [31] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie II: přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2000. ISBN 80-210-2272-8.
- [32] LITZMAN, Jiří. *Základy vyšetření v klinické imunologii*. 2., přepracované vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2015. ISBN 978-80-210-7853-6.
- [33] *Murex HIV Ag/Ab Combination: ELISA Infectious disease*. Italy, 2013. Dostupné také z: [https://www.diasorin.com/sites/default/files/allegati\\_prodotti/Murex%20HIV%20AgAb%20Combination.pdf](https://www.diasorin.com/sites/default/files/allegati_prodotti/Murex%20HIV%20AgAb%20Combination.pdf)

- [34] *HIV Ag/Ab Combo*. Germany, 2009. Dostupné také z:  
<http://www.ilexmedical.com/files/PDF/HIVAgAbCombo.pdf>
- [35] *Genscreen™ ULTRA HIV Ag-Ab*. France, 2013. Dostupné také z:  
[http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/cs/883637\\_2013\\_10\\_CZ.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/cs/883637_2013_10_CZ.pdf)
- [36] *NEW LAV BLOT I 18 stanovení: KONFIRMAČNÍ SOUPRAVA K DETEKCI PROTI LÁTEK ANTI-HIV1 V SÉRU/PLASMĚ IMUNOBLOTINGEM*. France, 2009. Dostupné také z: [http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/cs/883572\\_CZ.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/cs/883572_CZ.pdf)
- [37] *NEW LAV BLOT I • NEW LAV BLOT II: HIV Confirmation Gold Standard Assays BioRad*. France, 2010. Dostupné také z:  
<http://kimhung.vn/uploads/download/files/reagents-kits/new-lav-blot.pdf>
- [38] *Geenius™ HIV 1/2 Confirmatory Assay: KVALITATIVNÍ TEST KE KONFIRMACI A ROZLIŠENÍ JEDNOTLIVÝCH PROTI LÁTEK PROTI HIV-1 A HIV-2 VE VZORCÍCH PLNÉ KRVE, SÉRA NEBO PLAZMY*. France, 2013. Dostupné také z: [http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/cs/883601\\_CZ.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/cs/883601_CZ.pdf)
- [39] *VIDAS® HIV DUO Ultra (HIV5)*. France, 2015.
- [40] *VIDAS® HIV P24 II (P24)*. France, 2015.
- [41] *VIDAS® HIV P24 II Confirmation*. France, 2014.

- [42] PCR: POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR). In: *LAB Guide: Průvodce laboratoří* [online]. Česká republika: Skupina autorů, 2014 [cit. 2018-04-30]. Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/pcr/>
- [43] COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0. USA, 2012. Dostupné také z: [https://pim-eservices.roche.com/eLD\\_SF/cz/cs/Documents/GetDocument?documentId=d2887058-65f2-e311-98a1-00215a9b0ba8](https://pim-eservices.roche.com/eLD_SF/cz/cs/Documents/GetDocument?documentId=d2887058-65f2-e311-98a1-00215a9b0ba8)
- [44] PLK. MUDR. MILOŠ BOHONĚK, a Ing. LANDOVÁ PH.D. K problematice screeningu dárců krve na krví přenosné infekce v ČR a použití metod NAT. *Labor Aktuell*. 2017, **0117**(01), 4-7. ISSN 1211-5665.
- [45] *Grafy k tiskové zprávě NRL pro HIV-AIDS: Trendy vývoje a výskyt HIV-AIDS v ČR v roce 2017*. Praha, 2018. Dostupné také z: [http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/HIV\\_AIDS/rocni\\_zpravy/2017/Grafy\\_k\\_tiskove\\_zprave\\_NRL\\_pro\\_HIV\\_AIDS\\_2017.pdf](http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/HIV_AIDS/rocni_zpravy/2017/Grafy_k_tiskove_zprave_NRL_pro_HIV_AIDS_2017.pdf)
- [46] *HIV/AIDS surveillance in Europe 2017: 2016 data*. Sweden, 2017. Dostupné také z: [https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/20171127-Annual\\_HIV\\_Report\\_Cover%2BInner.pdf](https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/20171127-Annual_HIV_Report_Cover%2BInner.pdf)
- [47] MALÝ, Marek, Vratislav NĚMEČEK a Hana ZÁKOUCKÁ. *Výskyt a šíření HIV/AIDS v České republice v roce 2016: The prevalence and spread of HIV/AIDS in the Czech Republic in 2016*. SZÚ, PRAHA, 2017. Dostupné také z: [http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/HIV\\_AIDS/rocni\\_zpravy/2016/Vyrocn\\_i\\_zprava\\_o\\_vyskytu\\_a\\_sireni\\_HIV\\_AIDS\\_v\\_CR\\_v\\_roce\\_2016.pdf](http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/HIV_AIDS/rocni_zpravy/2016/Vyrocn_i_zprava_o_vyskytu_a_sireni_HIV_AIDS_v_CR_v_roce_2016.pdf)

- [48] *Prosinec 2017: výskyt a šíření HIV/AIDS v České republice*. Praha, 2018.  
Dostupné také z:  
[http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/HIV\\_AIDS/rocnizpravy/2017/HIV\\_AIDS\\_12\\_2017.pdf](http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/HIV_AIDS/rocnizpravy/2017/HIV_AIDS_12_2017.pdf)
- [49] LAPERCHE, Syria. Antigen-antibody combination assays for blood donor screening: weighing the advantages and costs. *Transfusion* [online]. 2008, 48(4), 576-579 [cit. 2018-05-08]. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2008.01676.x. ISSN 0041-1132. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1537-2995.2008.01676.x>
- [50] CHAPPEL, Roderick, Elizabeth M DAX a Kim WILSON.  
Immunoassays for the Diagnosis of HIV: Meeting Future Needs by Enhancing the Quality of Testing. *Future Microbiology* [online]. 2009, 4(8), 963-982 [cit. 2018-05-08]. Dostupné z:  
[https://www.medscape.com/viewarticle/715166\\_2](https://www.medscape.com/viewarticle/715166_2)
- [51] *HIV self testing* [online]. In: . UK: terrencehiggins trust, 2014 [cit. 2018-05-08].
- [52] *Advantages and Disadvantages of FDA-Approved HIV Assays Used for Screening, by test category*. USA, 2018. Dostupné také z:  
<https://www.cdc.gov/hiv/pdf/testing/hiv-tests-advantages-disadvantages.pdf>
- [53] *POKYNY PRO POUŽITÍ ORAQUICK*. OraQuick, 2012. Dostupné také z:  
[http://oraquick.cz/Navod\\_HIV1.pdf](http://oraquick.cz/Navod_HIV1.pdf)

- [54] *Fastest direct*. UK, 2017. Dostupné také z: <https://www.tht.org.uk/sexual-health/About-HIV/HIV-postal-test>
- [55] *UNAIDS DATA 2017*. Switzerland, 2017. Dostupné také z: [http://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/20170720\\_Data\\_book\\_2017\\_en.pdf](http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/20170720_Data_book_2017_en.pdf)



## 10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obr. 1 - Struktura viru HIV-1 (Poláčková 2018) .....	14
Obr. 2 - Chemokiny a jejich receptory (upraveno dle [8]) .....	18
Obr. 3 - Genom HIV-1 (Poláčková 2018) .....	21
Obr. 4 - Postup confirmace vzorku v NRL pro HIV/AIDS (upraveno dle [30]) .....	47
Obr. 5 – Princip sendvičové metody ELISA [33].....	49
Obr. 6 - Western blotový strip – pozitivní kontrola [37].....	53
Obr. 7 – Testovací kazeta Geenius™ HIV 1/2 Confirmatory Assay [38].....	55
Obr. 8 - Počet vyšetření a počet HIV+ v ČR v jednotlivých letech [45].....	65
Obr. 9 - Nově diagnostikovaní HIV+ pacienti podle země původu za rok 2016.....	65
Obr. 10 - Testování krevních vzorků v transfuzní službě [45].....	66
Obr. 11 - Počet nových případů AIDS v jednotlivých letech [45].....	67
Obr. 12 - Stadium AIDS – podíl pozdě zachycených případů [47]; [48].....	67
Obr. 13 – Dynamika markerů a záchytnost testů [30].....	72

## 11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tab. 1 – Popis western blotového stripu <sup>[36]</sup> . .....	52
Tab. 2 - Kritéria interpretace HIV-1 a HIV-2 <sup>[38]</sup> . .....	56
Tab. 3 – Možné výsledky analyzátoru Cobas TaqMan 48 <sup>[43]</sup> . .....	61
Tab. 4 – Obecný vývoj imunologických testů HIV od roku 1985 <sup>[50]</sup> . .....	69