

**ČESKÉ VYSOKÉ
UČENÍ TECHNICKÉ
V PRAZE**

**FAKULTA
BIOMEDICÍNSKÉHO
INŽENÝRSTVÍ**



**BAKALÁŘSKÁ
PRÁCE**

2018

**LUCIE
VALEŠOVÁ**

ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta biomedicínského inženýrství

Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Vyšetření infekčních markerů u dárců krve a jejích složek

**The Infectious Diseases Screening of Blood and Blood Components
Donors**

Bakalářská práce

Studijní program (Specializace ve zdravotnictví):

Studijní obor (Zdravotní laborant):

Vedoucí práce (Ing. Ludmila Landová, Ph.D.)

Lucie Valešová

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: **Lucie Valešová**
Obor: Zdravotní laborant
Téma: **Vyšetření infekčních markerů u dárců krve a jejich složek**
Téma anglicky: The Infectious Diseases Screening of Blood and Blood Components Donors

Zásady pro vypracování:

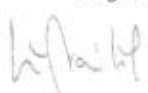
Předmětem bakalářské práce je komparace metod serologického a NAT vyšetření infekčních markerů u dárců krve (HBsAg/HBV DNA; a-HCV/HCV RNA; HIV1+2, Ag p24/HIV RNA; syphilis; HAV RNA; PVB19 DNA u dárců krve v ÚVN Praha a jejich odběrových střediscích. V teoretické části bude popsán zákonný podklad pro vyšetřování infekčních markerů u dárců krve, doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČSL JEP, jednotlivé infekční markery a přehled jednotlivých metodik zjišťování reaktivity. Metodická část bude zahrnovat popsání metod vyšetřování syphilis, HIV, HCV, HBV, HAV, PVB19 na OHKT ÚVN Praha. Výsledkem bakalářské práce bude statistické vyhodnocení infekčnosti dárců v ÚVN za rok 2016 a 2017, dále počet pozitivních dárců potvrzených Národními referenčními laboratořemi Státního zdravotního ústavu v Praze.

Seznam odborné literatury:

- [1] Zákon č. 378/2007 Sb., Zákon o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech), ze dne 6. prosince 2007 ve znění pozdějších předpisů
- [2] Vyhláška č. 143/2008 Sb., Vyhláška o stanovení bližších požadavků pro zajištění jakosti a bezpečnosti lidské krve a jejich složek (vyhláška o lidské krvi), ze dne 15. dubna 2008 ve znění pozdějších předpisů
- [3] TUREK P., MASOPUST J., Činnost transfuzní služby v České republice v období 1989-2013, Trans Hematol dnes, číslo 20(4), 2014, 125-135 s.
- [4] PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ, Hematologie a transfuzní lékařství, Praha: Grada, 2012, 192 s., ISBN 978-80-247-3460-6

Zadání platné do: 13.09.2019

Vedoucí: Ing. Ludmila Landová, Ph.D.


.....
vedoucí katedry / pracoviště


.....
děkan

V Kladně dne 25.10.2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Vyšetření infekčních markerů u dárců krve a jejích složek 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

Ráda bych chtěla touto cestou poděkovat zejména Ing. Ludmile Landové Ph.D. za pomoc a odborné vedení při psaní mé bakalářské práce. Zároveň i všem pracovníkům z Oddělení hematologie a krevní transfúze na pracovišti Ústřední vojenské nemocnice v Praze, kteří mi poskytli podmínky pro její zpracování.

Abstrakt

Tématem mé bakalářské práce je komparace metod serologických a NAT vyšetření infekčních markerů u dárců krve a jejích složek. Mezi povinně vyšetřované infekční markery dle Vyhlášky 143/2008 Sb. (Vyhláška o stanovení bližších požadavků pro zajištění jakosti a bezpečnosti lidské krve a jejích složek (tzv. vyhláška o lidské krvi) patří vyšetření povrchového antigenu viru hepatitidy B, HBsAg, protilátky proti hepatitidě typu C, anti-HCV, protilátky proti viru lidské imunitní nedostatečnosti a jeho antigen, anti-HIV 1/2+Agp24 a vyšetření na syfilis, protilátky proti *Treponema pallidum*. U dárců krve v ÚVN Praha je dále vyšetřována přítomnost nukleových kyselin ve vzorku dárce v tomto rozsahu: HBV DNA, HCV RNA, HIV RNA, HAV RNA a PV B19 DNA, metodou NAT.

Stanovení infekčních markerů sérologickými metodami patří mezi základní screeningová vyšetření z důvodu možnosti přenosu infekčních onemocnění. Ačkoli toto riziko zdokonalováním vyšetřovacích metod se postupně snižuje, stále zůstává nejpálčivější hrozbou transfuzní medicíny.

Cílem bakalářské práce je v teoretické a metodické části popsat a charakterizovat jednotlivé infekční onemocnění a testované markery, popsat principy jednotlivých metodik stanovení infekčních markerů (NAT a sérologicky), popsat rozdíly v detekci jednotlivých metod. Bude podrobně vysvětlen look back transfuzního přípravku, postup při zjištění reaktivity vzorku a funkce jednotlivých analyzátorů, na kterých se vyšetření provádí.

Výsledkem bakalářské práce bude statistické vyhodnocení infekčních markerů v ÚVN za rok 2016 a 2017, dále počet pozitivních dárců potvrzených Národními referenčními laboratořemi Státního zdravotního ústavu v Praze u dárců z ÚVN a jejích odběrových středisek. Součástí výsledků bude také vyhodnocení tzv. NAT reactive only vzorků tj. takových, které jsou reaktivní pouze metodou NAT nikoliv však serologicky.

Klíčová slova

NAT, HBsAg, PVB 19, HIV 1+2, Agp24, anti-HCV, HBV DNA, HCV RNA, HIV RNA, HAV RNA a PV B19 DNA

Infekční markery; serologické a NAT vyšetření; hepatitidy; reaktivní a pozitivní dárci; Národní referenční laboratoř; Ústřední vojenská nemocnice

Abstract

The topic of my bachelor paper is the comparison of serological screening method with nucleic acid tests (NAT) diagnostic method of blood borne pathogens at blood donors. As mandatory tests according to Decree of Ministry of Health Czech Republic No 142/2008 lc. („Decree on Blood“), are screening of HBsAg, anti-HCV, anti-HIV+Agp24 and syphilis. In Military University Hospital Prague are blood donors tested in addition with these NAT: these, HBV DNA, HCV RNA, HIV RNA, HAV RNA and PV B19 DNA. Serological screening of blood borne infections, as basic method, are improved and risk of pathogen transmission is gradually decreasing. Nevertheless is still a leading problem of transfusion medicine.

The aim of the paper is to describe mentioned infectious diseases and laboratory markers, principles and differences. As well, look-back procedures for transfusion agents will be explained if reactivity is detected. Statistical analyzes of infectious markers tested in Military University Hospital in 2016 – 2017 will be presented in the results, included positive confirmed donor in the National Reference Laboratory in Prague, as well as “NAT positive results only”.

Keywords

NAT, HBsAg, PVB 19, HIV 1+2, Agp24, anti-HCV, HBV DNA, HCV RNA, HIV RNA, HAV RNA a PV B19 DNA

Infectious markers; serologic and NAT; hepatitis; reactive and positive donors; Department of the National reference laboratory; Central military hospital

Obsah

1	Úvod	11
1.1	Historie transfuze	12
1.2	Dárcovství krve a jejích složek	13
1.2.1	Nábor dárců krve	14
1.2.2	Výběr dárců krve	15
1.3	Infekční markery u dárců krve	17
1.3.1	Hepatitida A (HAV).....	19
1.3.2	Hepatitida B (HBV)	21
1.3.3	Hepatitida C (HCV).....	23
1.3.4	HIV/ AIDS.....	25
1.3.5	Syfilis	27
1.3.6	Parvovirus B19.....	29
1.3.7	Vyšetřování infekčních markerů.....	31
2	Cíl práce	34
3	Metodika.....	35
3.1	Serologická vyšetření (a-HCV, syfilis, HBsAg, a-HIV1+2,Agp24)	35
3.1.1	Primární vzorky	35
3.2	Serologické vyšetření.....	36

3.2.1	2.1 Zařízení:.....	36
3.2.2	3.1 Použité metody a jejich názvy:	39
3.2.3	Vyšetření HBsAg, anti-HCV, HIV a syfilis	39
	Vyšetření anti-HCV	40
	Vyšetření HIV	41
	Vyšetření na syfilis	42
3.3	Stanovení nukleové kyseliny infekčních markerů metodou NAT	44
2.1	<i>Zařízení</i>	44
3.4	2.2 Reagencie a roztoky pro stanovení HBV DNA, HCV RNA, HIV RNA 45	
3.5	2.3 Spotřební materiál.....	45
3.6	2.4. primární vzorky.....	46
3	Princip stanovení	47
	3.6.1 Vyšetření HAV NAT, B19 NAT.....	51
	<i>Hodnocení</i>	56
4	Výsledky	60
5	Diskuze	67
7	Závěr	70
8	Seznam použitých zkratk	71
9	Seznam použité literatury	72
10	Seznam Použitých tabulek.....	80
11	Seznam Příloh.....	81

1 ÚVOD

Problematika dárcovství krve je v současné době stále aktuálním tématem. Hlavním důvodem zůstává, že doposud nebylo možné vytvořit spolehlivou náhradu této tekutiny, která by měla stejné vlastnosti jako krev včetně jejich léčivých účinků bez vedlejších dopadů na zdraví pacienta. Proto je odběr krve od dobrovolných dárců v medicíně nepostradatelný. Nejčastěji používaným způsob, jak podávat krev a její složky je právě podání krevní transfuze. S tím jsou však spojena rizika přenosu infekčních onemocnění, přičemž tuto míru rizika lze snížit, ale nelze jej zcela vyloučit (7, 10).

Nároky na bezpečnost krve a krevních složek se každým desetiletím zvyšují. Bohužel i přes vývoj a důraz v prevenci před odběrem se stále nepodařilo předejít riziku - (i když v dnešní době minimálnímu) - následného přenosu infekčních onemocnění (7).

V České republice je každý rok odebráno cca 400 000 dárců plné krve a téměř 700 000 dárců plazmy, a každý z nich může být potencionálním nosičem infekční nemoci. V této oblasti se stále zavádějí modernější a účinnější metody vyšetření, přičemž jednou z nich je zavedení molekulárně biologických testů, které mají za cíl zkrátit diagnostické okno, ale i přesto je stále nulové zamezení přenosu neřešitelným problémem (např. okultní hepatitida B) (16). Je to dáno tím, že zmiňované nežádoucí účinky sebou přinášejí hned několik rizik, která jsou celosvětově známá a jsou příčinou nových nálezů příjemců. Proto je kladen důraz na možnou kontaminaci krevní transfuze, vhodný výběr bezpříspěvkových dárců, použití screeningových vyšetření, deleukotizace transfuzních přípravků atd (10)

1.1 Historie transfuze

Zmínky o tak vzácné tekutině, jako je krev, můžeme najít už ve Starověku v období starých Egypťanů a Římanů. V postupném vývoji medicíny byla zaznamenána první snaha o realizaci krevní transfuze v roce 1492 italským historikem a právníkem Stephanem Infessurem. Hlavním poznatkem bylo objevení krevního oběhu, který měl velký přínos pro léčbu krve. Tento objev zveřejnil v anatomické studii o pohybu srdce a cirkulaci srdce u zvířat anglický lékař William Harvey v roce 1616, své pokusy prováděl na zvířatech, později se věnoval studiím u člověka. Zjistil, že za pouhou 1 hodinu projde lidským srdcem trojnásobek váhy lidského těla (1).

V roce 1656 byli italským matematikem, fyzikem a lékařem Giovanim Alfonom Borelli (1608–79) objeveny lymfocyty, v r. 1658 erytrocyty nizozemským přírodovědcem Janem Swammedamem (1).

Důležitým obdobím v transfuzní medicíně byl rok 1667, kdy byla poprvé člověku podána první ověřená a úspěšná transfuze (2). Na to navázal v roce 1818 britský gynekolog a porodník James Blundell, který úspěšně aplikoval krevní transfuzi své pacientce. Další úspěšná transfuze byla poskytnuta při léčbě hemofilie v roce 1840. Během historie se našlo mnoho dalších úspěšných osobností, které svým objevem přispěli do oblasti transfuzní medicíny. Zejména Joseph Lister, který v roce 1867 jako první použil antiseptika k zabránění kontaminace při transfundování svého pacienta. Během 19. století byl použit citrónan sodný jako antikoagulans, došlo k vytvoření první krevní banky a skladu pro krevní složky a vývoj nastal i v etanolové frakcionaci plazmy. V neposlední řadě, z českých vědců se zapsal do hematologie lékař Jan Jánský (1873–1921), který rozlišil lidskou krev do čtyř krevních skupin (2). Druhá světová válka přinesla převrat v historii, a to

zejména v transfuzní službě. Samotný laboratorní screening infekčních markerů u dárců krve se prováděl už od 20.století (2).

1.2 Dárcovství krve a jejích složek

Dárcovství krve je dobrovolné a bezplatné, a to v souladu s Etickým kodexem darování krve a léčby krevní transfuze (3).

Bezplatné a bezpříspěvkové dárcovství

V současnosti je preferováno dobrovolné, bezplatné a bezpříspěvkové dárcovství, opírající se o mezinárodně uznávanou definici Červeného kříže (58). Je tedy nutné odpovědět na otázky: Jaká je charakteristika dobrovolného, bezplatného a bezpříspěvkového dárce? Co všechno lze ještě považovat za ocenění a kdy jde o odměnu - finanční, nebo ve formě nepřímých výhod?

K tomu, aby se dalo jasně rozlišit, o který druh dárcovství jde, byla ligou společností Červeného kříže a Červeného půlměsíce na jejich VIII. valném shromáždění v Budapešti v roce 1992 formulována následující mezinárodní definice dobrovolného bezplatného dárcovství krve:

„Dobrovolnými bezplatnými dárci krve jsou ti, kteří dávají krev, plazmu, nebo další součásti krve ze své vlastní svobodné vůle, aniž by za to dostali odměnu ve formě peněz nebo něčeho jiného, co může být považováno za ekvivalent peněz, například čas z pracovní doby přesahující čas nezbytný na cestu tam a zpět a na odběr samotný. Malé pozornosti, občerstvení a úhrada přímých cestovních výloh jsou s bezpříspěvkovým dárcovstvím slučitelné“ (38). Český Červený kříž ještě navíc uvádí definici úplného bezpříspěvkového dárcovství: „Dobrovolnými bezpříspěvkovými dárci krve jsou ti, kteří dávají krev, plazmu, nebo další součásti krve ze své vlastní svobodné vůle, aniž by v bezprostřední souvislosti s odběrem krve, nebo její složky přijali v hotovosti jakýkoli finanční příspěvek nad rámec skutečně vynaloženým cestovních výloh, tedy ani příspěvek na stravování, paušál cestovních výloh či jiné kompenzace“ (38).

Český Červený kříž se vyjadřuje k tomu, proč jsou nutné definice dvě. Termíny bezplatné a bezpříspěvkové dárcovství jsou u nás totiž užívány souběžně. Porovnájí-li se však vzájemně mezi sebou, bezpříspěvkové dárcovství vylučuje jakoukoliv platbu při odběru, tedy nad rámec doloženého cestovného. Jde tak o silnější požadavek než v mezinárodní definici bezplatného dárcovství (38). Dosáhnout celosvětově dobrovolného, bezplatného či bezpříspěvkového dárcovství je také snahou Světové zdravotnické organizace (WHO). Ta v roce 1997 představila politiku 100 % bezplatného dárcovství krve. Celosvětově se však do dnešních dní nedaří tuto politiku naplnit a zajistit tak bezpečné zásoby krve výhradně od bezplatných dobrovolných dárců (39).

Darování krve je v legislativě České republiky ošetřeno v řadě obecně závazných právních předpisů. (Vyhláška Ministerstva zdravotnictví ČR, MZ ČR, č. 143/2008 Sb. O lidské krvi, ze dne 15.dubna 2008 stanovuje požadavky pro zajištění a bezpečnost lidské krve a jejich složek, Věstník MZ ČR 03/2008, Odpovědnost dárců – Rezoluce Rady Evropy 2008, Metodické opatření MZ ČR Č. j. (4).

Krev určená pro výrobu transfuzního přípravku by měla být především získána od dobrovolného dárce, a to z toho důvodu, že dárce motivovaný finančním ziskem častěji zatají závažné údaje o svém zdravotním stavu nebo rizicích s tím spojené. (*„Vyšší výskyt infekčních markerů ve skupině placených dárců oproti neplaceným dárcům byl opakovaně prokázán.“*) *Dárcovství krve je považováno za dobrovolné a bezplatné, pokud tak osoba, která krev, plazmu nebo krevní buňky dává, činí z vlastní svobodné vůle a nedostává za to žádnou úplatu v hotovosti nebo způsobem, který je možné považovat za náhrádku peněz.* (4, s. 21)

1.2.1 Nábor dárců krve

Nábor dárců krve a jejich složek není v ČR centralizován. Na celospolečenské úrovni propaguje dárcovství krve Český červený kříž (ČČK) a

řada občanských sdružení, podílejí se i orgány státní správy. Na místní úrovni je nábor dárců v kompetenci jednotlivých zařízení transfuzní služby, které obvykle spolupracují s místními spolky ČČK a jinými organizacemi. _(4). Po vyplnění dotazníku, který dárce obdrží při vstupu, vyplní zodpovědně a pravdivě. Tento dotazník obsahuje důležité informace o zdraví dárce. Zodpovězené otázky zhodnotí lékař a určí způsobilost dárce. Pokud splňuje veškeré podmínky dárcovství krve, může být připuštěn k prvnímu odběru plné krve, z které se provede serologické vyšetření pro zjištění případné infekční nemoci_(5).

1.2.2 Výběr dárců krve

Dárcem krve dle vyhlášky MZ ČR č. 143/2008 Sb., se může stát ten, kdo splňuje tzv. podmínky dárcovství. Cílem je vybrat vhodného dárce, který svým darováním neohrozí jak své zdraví, tak bezpečnost v léčebných účelech druhé_(6).

Dárcem krve může být každý, kdo splňuje stanovené limity: věk 18 – 65 let (prvodárci do 60 let), tělesná hmotnost ≥ 50 kg, uspokojivý zdravotní stav. Po konzultaci s lékařem a detailní konzultaci u Dotazníku dárce krve (viz níže), je dárci změřen krevní tlak, puls a teplota. Ta by měla být maximálně 37 °C, tlak nesmí být vyšší než 180 mmHg, hodnota diastolického tlaku nesmí být větší než 100 mmHg. Dále se před každým odběrem vyšetřuje hemoglobin, u žen nesmí být hladina nižší než 125 g/l, u mužů nižší než 135 g/l (4, s. 21,22).

Základní požadavky na vyšetření odběru plné krve a plazmy jsou nastaveny dle Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/98/ES ze dne 27.ledna 2003, kterou se stanoví standardy jakosti a bezpečnosti pro odběr, vyšetření, zpracování, skladování a distribuci lidské krve a krevních složek a kterou se mění směrnice 2001/83/ES (7, s. 171).

Dárce sám před odběrem vyplňuje tzv. Dotazník dárce krve, který obsahuje otázky týkající se rizikového chování, zdravotního stavu a poučení dárce. Dárce stvrzuje svým podpisem pravdivost těchto údajů, souhlas s tím, aby léčivé

přípravky, vyrobené z jeho krve byly použity v souladu s medicínskými, etickými a humanitárními principy k léčbě nemocných v rámci platné legislativy pouze v případě, že budou vyhovovat požadavkům na jejich bezpečnost a jakost.

Za jeho přijetí či nepřijetí dárce k odběru krve zodpovídá proškolený pracovník ZTS (4).

Tab. 1 - Minimální rozsah před odběrového vyšetření (4, s. 23)

<i>Druh odběru</i>	<i>Parametr</i>	<i>Kritické hodnoty</i>	<i>Frekvence vyšetření</i>
Odběr plné krve	<i>Hemoglobin</i>	<i>U žen: 125 g/l a vyšší</i> <i>U mužů: 135 g/l a vyšší</i>	<i>Při každém odběru</i>
Plazmaferéza	<i>Celková bílkovina</i>	<i>60 g/l a vyšší</i>	<i>1 krát ročně</i>
Trombocytaferéza	<i>Počet trombocytů</i>	<i>150 × 10⁹ / l a vyšší</i>	<i>Při každém odběru</i>
Erythrocytaferéza	<i>Hb před odběrem</i>	<i>140 g/l a vyšší</i>	<i>Při každém odběru</i>
	<i>Hemoglobin po odběru</i>	<i>Očekávaná hodnota 100 g/l</i>	<i>Při každém odběru</i>

1.3 Infekční markery u dárců krve

Infekční lékařství je obor, který se zabývá diagnostikou, léčením a výzkumem nemoci, v jejichž patogenezi hraje rozhodující úlohu infekční proces a agens. (8)

Do této skupiny jsou zařazeny i infekce, u nichž dochází k tzv. virémii, bakteriémii prostřednictvím darované krve, speciálních krevních produktů, biologických materiálů, transplantovaných orgánů či tkání, parenterálními zákroky, nástroji kontaminovanými krví, dále kontaminovanými jehlami a stříkačkami mezi intravenózními narkomany, dochází k přenosu nákazy (31).

Hlavním problémem pro diagnostiku a vyhodnocení odebrané krve je tzv. diagnostické okno, které se u jednotlivých onemocnění liší. Jedná se o období, kdy není v krvi dárce infekce sérologicky prokazatelná. Proto se kromě zvyšování citlivosti sérologických metod doplňují postupy vyšetřování dárců krve metodami, které umožní další výrazně zkrátit období diagnostického okna. Tyto citlivé metody fungují na principu přímého průkazu infekčních agens, které jsou založeny na potvrzení přítomnosti nukleových kyselin v krvi dárce (Nucleic acid – testing – NAT) s využitím polymerázové řetězové reakce v reálném čase (real-time PCR). V průběhu vyšetření dochází ke sledování této reakce, která je zpracována pomocí fluorescenčních sond, barviv a vyhodnocena fluorescencí. Podstatnou výhodou této metody je rychlý a citlivý průkaz specifického úseku DNA nebo RNA u infekčního agens (8, 2).

V porovnání diagnostického okna u serologického a NAT je vyšetření je poměrně znatelný. Diagnostické okno u serologického vyšetření je u HIV 2-3 týdny, HBV 4-6 týdnů a u HCV 2-6 měsíců. Při použití molekulárně biologických metod je diagnostické okno zkráceno u HIV o 7-9 dnů, u HBV o 25-30 dnů a u HCV je to 59-65 dnů. Z toho tedy vyplývá, že každého vyšetření infekční nemoci lze snížit riziko diagnostického okna díky možnosti rozšíření screeningu o

molekulárně biologické metody, kterými se zjišťuje přítomnost nukleové kyseliny daného viru (9, 10). Ve světě má testování dárců krve metodami NAT již poměrně dlouhou tradici, od roku 1997, kdy bylo poprvé zavedeno v SRN a postupně se rozšířilo do většiny zemí světa.

Na OHKT ÚVN Praha bylo zavedeno NAT testování dárců krve v roce 2013 z důvodu zvýšení bezpečnosti transfuzních přípravků v rámci spojeneckých zemí NATO – uloženo také Českým obranným standardem (č.650003 – Minimální požadavky na krev, dárce krve, vybavení pro krevní transfuzi a označení krevních skupin). Od září 2013 jsou dárce krve a jejich složek v ÚVN Praha sérologicky vyšetřeni elektrochemiluminiscenční metodou (EC – LIA) na analyzátoru cobas® 8000 (Roche) – HbsAg, anti – HCV, anti HIV 1+2, Agp24 a syphilis a souběžně NAT (HIV, HBV, HCV) metodou real-time PCR na analyzátoru cobas® s201 (Roche). V roce 2014 bylo dále zavedeno NAT testování HAV a parvoviru B19. Detekce nukleové kyseliny je prováděna v poolech plazmy dárců dvěma metodami: MPX v 2.0 (RNA HIV, DNA HBV, RNA HCV) v poolu 96 a metodou DPX (RNA HAV, DNA PVB19) v poolu 480 (pool = směsný vzorek z příslušného počtu primárních vzorků) (10).

1.3.1 Hepatitida A (HAV)

Klinické projevy:

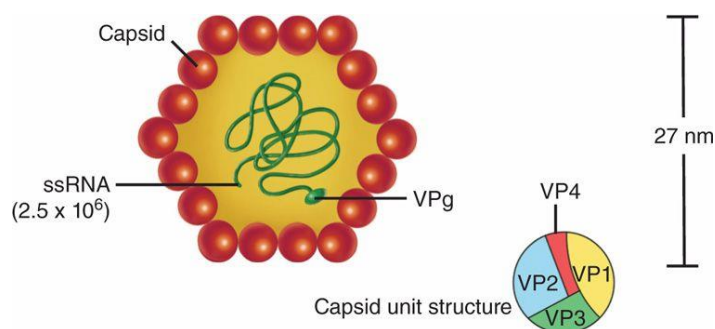
Jedná se o onemocnění charakterizované zánětem jater, který je nejčastěji způsoben virovými původci. Toto onemocnění je známé pod slangovým názvem „*nemoc špinavých rukou*“. Nejčastěji se vyskytuje v oblastech s nízkým hygienickým standardem. Projevuje se zejména střevními a chřipkovými příznaky (13). U dětí má toto onemocnění obvykle mírný až asymptomatický průběh, tato četnost se se zrůstajícím věkem zvyšuje. U dospělých jedinců se nemoc může projevit žloutenkou (40).

Původce

Původcem nákazy je virus hepatitidy A (HAV). Jedná se o RNA virus o průměru 27 nm. Patří do čeledi *Picornaviridae*. Tento virus je velice odolný a je rezistentní i ke kyselé žaludeční šťávě. Zdrojem jsou lidé akutně nemocní a bezpříznakoví nosiči. Cesta přenosu je hlavně fekálně-orální. Vzniká přímým kontaktem s infikovanou osobou nebo kontaminovanou potravou. Inkubační doba je 14–50 dní (13).

Virus a jeho stavba

HAV je 27 nm velká, neobalená částice s kubicky symetrickou kapsidou. Obsahuje RNA (ssRNA). Vyskytuje se v jediném antigenním typu, ale známy jsou čtyři lidské genotypy (23).



Obr. 1 - Stavba viru hepatitidy A_(41)

Patogeneze a prevence onemocnění

Toto onemocnění se nemá výrazné projevy. Virus se během infekce šíří mezi populaci. K roku 2017 bylo v Evropské unii hlášeno 1500 potvrzených a 2660 možných případů nákazy hepatitidou A. Hlavními příznaky jsou teplota, nechutenství, nevolnost, bolest břicha a celkové oslabení organismu. Největší nakažlivost se udává v druhé polovině inkubační doby. Diagnóza je prokázána serologickým vyšetřením. Anti HAV Ig protilátky a detekce HAV-RNA v séru či plasmě indikuje akutní infekci. V pokročilejším stádiu nemoci následuje zežloutnutí kůže a očí, ztmavnutí moči a extrémní únava. Nemoc trvá několik týdnů a je spojená s izolací na infekční oddělení. Rekonvalescence trvá několik měsíců a je spojena s dietou a pohybovou aktivitou (40).

Hlavní prevencí je udržování pravidelné hygieny, konzumovat nezávadné potraviny a vodu. Je nezbytné absolvovat očkování proti žloutence typu A. Další možností prevence je poskytnout primární poradenství v oblasti prevence VHA a podpora preventivního očkování ve zdravotnických zařízeních (10, 11, 40)

Laboratorní vyšetření

Diagnostika je prokazatelná při přítomnosti protilátek proti viru HAV. Pokud jsou protilátky ve třídě IgM, jedná se o akutní fázi hepatitidy. Ve třídě IgG se jedná o prodělanou HAV. Vyšetření je možné provádět ze stolice nebo jaterní

tkáně, kde se zjišťuje přítomnost hepatitis A – antigen (HAAg). Ze séra se provádí časný a dostupný test, kterým hledáme hepatitis A protilátky – IgM (anti-HAV-IgM). Vzestup takových to protilátek nastává po 4 týdnech po infekci a nejvyšší hladina protilátek je mezi 21. a 30. dnem onemocnění (10, 11).

1.3.2 Hepatitida B (HBV)

Klinické projevy

Vysoce odolný virus, který je tvořen až 5 % populace. Přenáší se zejména tělními tekutinami, v krvi přežívá i několik týdnů, napadá zejména játra. Onemocnění bývá těžší a léčba delší. Projevuje se zejména chřipkovými příznaky, později, bolestmi kloubů a nervovými projevy (21).

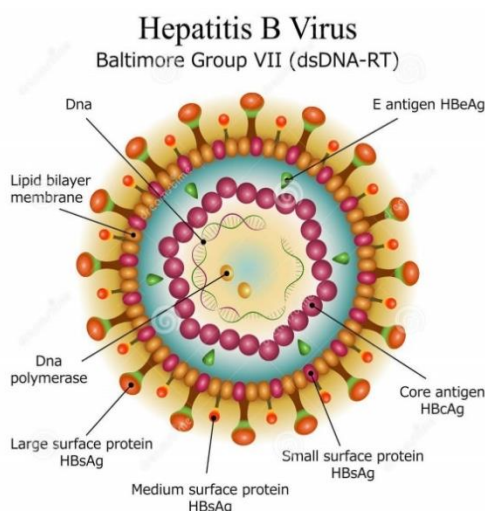
Původce

Zdrojem nákazy je infikovaný člověk, který tělními tekutinami přenáší infekční onemocnění dále. Pro přenos stačí malé množství krve, sperma či poševního sekretu. K jeho přenosu může dojít ve zdravotnickém zařízení a všude tam, kde může dojít k porušení kůže. Významný je přenos nechráněným pohlavním stykem (21).

Virus a jeho stavba

Jedná se o DNA virus, který je schopný tvořit v infikované buňce tři typy částic. Daneony (velikost 42-47 nm), kulovité partikule a kratší vlákna. Všechny tyto částice se vyznačují přítomností povrchového antigenu HBsAg (australský antigen). Pouze Daneova částice tvořena lipoproteinovým obalem je infekční. Právě pod obalem se nachází virová dřeň s virovou DNA (23).

Virus také používá přechodně RNA, která se zpětně kopíruje na DNA. Proto je tento virus přežívá i několik týdnů a při teplotě -15°C vydrží déle než 15 let. Ač se to nezdá, tato nemoc je až $100 \times$ nakažlivější než HIV (11).



Obr. 2 - Stavba viru hepatitidy B_(42)

Patogeneze a prevence

Akutní virová hepatitida patří mezi rizikové onemocnění. Ročně je hlášeno 300-400 případů. Kolem 5 % infekční populace přechází z akutní fáze do chronické. Pravděpodobnost chronicity u novorozenců infikovaných HBV vertikálně od matky je vyšší než 90 %. Infekce novorozenců a dětí je v současné době v ČR výjimečná z důvodu předčasného screeningu těhotných žen na přítomnost HBsAg. Pro tuto infekci je typicky dlouhá inkubační doba (skoro tři měsíce). Virus se množí v hepatocytech, které později poškozuje. Z klinického hlediska lze hepatitidu B rozdělit na akutní a chronickou, asymptomatické nosičství a hepatocelulární karcinom. Akutní fáze představuje 80 % případů. Chronická nastává tehdy, když zánět jater trvá déle než 6 měsíců. Později může dojít až k jaterní cirhóze či hepatocelulárnímu karcinomu. Asymptomatické nosičství nastává tehdy, pokud nejsou přítomny známky jaterního poškození.

Hlavní prevencí u této žloutenky je vakcinace a používání pohlavní ochrany z důvodu možnosti přenosu nemoci i sexuální cestou (23, 43).

Laboratorní vyšetření

Provádí se průkaz markerů hepatitid (HBsAg, HbeAg, anti-HBs, anti-HBc a anti-HBe). Akutní infekce se projevuje přítomností HBsAg, HbeAg a anti-HBc. Během rekonvalescence vymizí HBsAg a HbeAg a objeví se protilátky anti-HBs, anti-HBc a anti-HBe. Přítomnost protilátky anti-HBs vyjadřuje uzdravení a vzniklou imunitu vůči opakované infekci. V daleko menší míře se používají hybridizační techniky, případně PCR (23).

1.3.3 Hepatitida C (HCV)

Klinické projevy:

Hepatitida C způsobuje zánětlivé onemocnění jater s pomalým rozvojem. Neprojevuje se žádnými příznaky, a proto je virus většinou odhalen při krevním vyšetření. Tento typ žloutenky se dá léčit, ale ne proti ní očkovat (24).

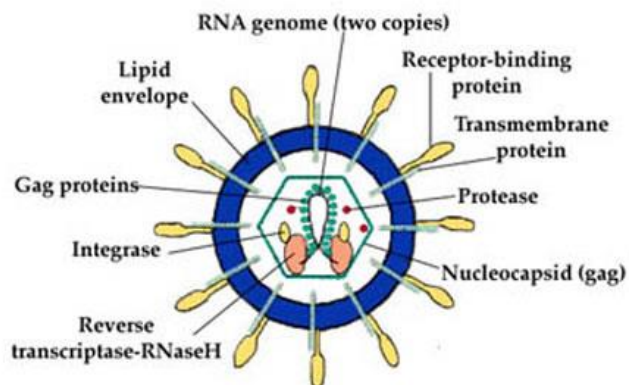
Původce

Jedná se o obalený virus RNA zařazen mezi flaviviry z rodu Hepacivirus. Zdrojem infekce je infikovaný člověk a jeho krev. Proto je zvýšené riziko přenosu a nákazy u transplantací, transfúzí a dialyzovaných pacientů. Dále je možný přenos pohlavním stykem nebo přenos z matky na dítě (23).

Virus a jeho stavba

HCV je obalený virus RNA. Má ikosahedrální stavbu. Nepravidelný virion má v průměru 40-60 nm. Virion obsahuje jediný gen kódující polyprotein.

Rozlišuje se 6 hlavních genotypů a více než 50 subtypů. V ČR převládá genotyp 1b, který hůře reaguje na antivirovou léčbu (23).



Obr. 3 - Stavba viru HCV (44)

Patogeneze a prevence

Je zaznamenáno 150–170 miliónů infikovaných lidí ve světě. Tato nemoc je zákeřná tím, že může být několik let bez příznaků. Po letech přechází do chronické fáze, která se projevuje cirhózou, rakovinou jater až selháním jater. Akutní onemocnění je možné léčit. Inkubační doba je 14-180 dní.

V současné době neexistuje vakcína proti této nemoci. Důležitou prevencí je zavedení vyšetření dárců krve a používání jednorázových jehel. Pro určení diagnózy jsou důležité výsledky biochemického a sérologického vyšetření (10, 11).

Laboratorní vyšetření

Užívá se průkaz protilátek IgG metodou ELISA. Nález lze ověřit pomocí imunoblotu metodou RIBA (Recombinant ImmunoBlot Assay) a v časných fázích infekce lze prokázat virovou RNA v séru pomocí PCR (23).

1.3.4 HIV/ AIDS

Klinické projevy

Výskyt tohoto onemocnění je problémem celosvětovým, nyní je odhad kolem 35 miliónů nemocných osob. Jsou známy dva typy HIV. HIV 1 a HIV 2, HIV 1 je více agresivnější, a proto se vyskytuje častěji. Nakažlivost začíná replikací viru, a to ještě v inkubační době a trvá až do konce života. Projevem nemoci je horečka, hubnutí, průjmy, vyskytují se bakteriální, virové a parazitární infekce. Organismu celkově oslabován (10).

Původce

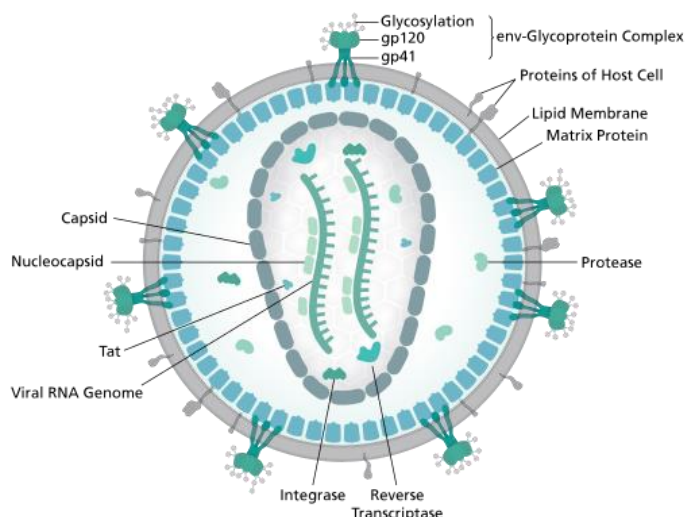
Nejčastějším typem přenosu infekce HIV je přenos sexuálním stykem, a to zejména u homosexuálů a heterosexuálů. Dalším možným přenosem jsou kontaminované jehly a stříkačky u intravenózních narkomanů. V neposlední řadě, jak může dojít k přenosu je z matky na dítě, a to jak transplacentárně, tak i perinatální cestou (10).

Virus a jeho stavba

Virus patří mezi RNA viry rodu Retroviridae skupiny Lentivirinae s jednovazcovou lineární + RNA. Obal má původ v hostitelské buňce. Větší molekula Gp 160 se buněčnými enzymy štěpí na menší molekuly Gp 120 a Gp 41. Gp 120 se váže na receptor buňky, Gp 41 je aktivní ve fúzi. Po průniku do organismu vnikají nejprve do buňky lymfocytu, kde až po replikaci a zpětném výstupu do krve způsobují protilátkovou reakci. Právě reverzní transkriptáza vytváří kopii genomu RNA do DNA, integráza, která začleňuje tuto DNA do chromozomu hostitelské buňky (10).

Virus se adsorbuje na receptor leukocytů CD 4. Virová RNA se v cytoplazmě hostitelské buňky překopíruje do DNA cirkulární a lineární. Lineární

přechází do jádra a integruje se do chromozomu hostitelské buňky. Integrovaná virová DNA se označuje jako provirus. Tato DNA se zpětně transkriptuje do RNA, přičemž započte translace nebo-li syntéza virových bílkovin. To má pak vliv na získání obalu HIV, který lyzuje buňky T4 a tím způsobuje imunosupresi (10).



Obr. 4 - Stavba viru HIV_(45)

Patogeneze a prevence

V současné době se stále infekce HIV vyskytuje, ale není to tak v enormním množství, jako tomu bylo v minulosti. Inkubační doba bývá 2-6 týdnů, někdy i několik měsíců. Bez léčby postižený umírá do 10 let. Onemocnění lze rozdělit dle průběhu nemoci do několika stádií.

- Primoinfekce HIV – příznaky jsou podobné chřipce. Nastává po 2-4 týdnech od nákazy a odeznívá za 1-3 týdny.
- Bezpříznakové stádium – je bez klinických příznaků a subklinických obtíží.
- Časné symptomatické stádium – je provázeno celkovými obtížemi, které se projevují horečkou, únavou, úbytkem na váze. Navazují malé oportunní infekce a imunopatologické projevy.

- Pozdní symptomatické stadium – lze nazvat konečným stadiem HIV a počátečným pro AIDS (Acquired Immuno-Deficiency Syndrome) (25).

Laboratorní vyšetření

Mezi základní vyšetřovací metody patří ELISA pro určení virových peptidů, metoda molekulárně biologická PCR pro určení virových nukleových kyselin. Dále se provádí stanovení antigenu p24 objevujícího se při akutní HIV a při AIDS, stanovení protilátek anti-HIV1, anti-HIV objevující se 1-3 měsíce po infikování. Stanovuje se i množství CD4+ lymfocytů v poměru k CD8 (CD4/CD8 1:2), poměr je obrácený než u zdravého člověka (25).

1.3.5 Syfilis

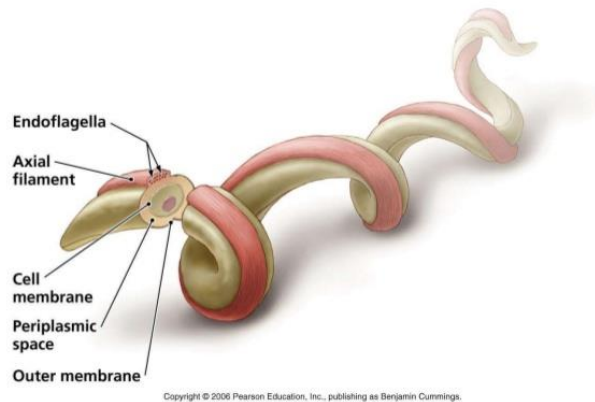
Klinické projevy

Jedná se pohlavně přenosnou chorobu, která je vyvolána bakterií spirálovitého tvaru – spirochéta *Treponema pallidum*. V minulosti se jednalo o jedno z nejrozšířenějších a nejnebezpečnějších onemocnění. V současné době se riziku přenosu předchází důkladnému testování dárců krve (17, 18).

Původce

Jediným hostitelem této bakterie je člověk. K přenosu dochází pohlavním stykem (vaginálním, análním a orálním). Bránou vstupu jsou drobné poranění kůže a sliznice. Pokud je těhotná žena nositelkou tohoto onemocnění, může nákazu přenést na plod nebo se narozené dítě nakazí mateřským mlékem při kojení. Následně to může končit a smrtí novorozence (17, 18).

Treponema Pallidum



Obr. 5 - Stavba bakterie *Treponema pallidum* (46)

Patogeneze a prevence

Nemoc probíhá ve třech stádiích, při kterém dochází k poškození organismu, demenci až smrti. Pokud je včas diagnostikována, je možná léčba antibiotiky. Postihuje vnitřní orgány, kůži, kardiovaskulární, pohybový a centrální nervový systém. Syfilis podléhá povinnému hlášení hygienické stanici. Onemocnění se vyskytuje nejčastěji ve věkové skupině 15-30 let. Inkubační doba je v rozmezí 10-90 dní.

Primární stádium syfilisu se projevuje vznikem rudého tvrdého nebolestivého vředu (*ulcus durum*), který se objeví za 3 týdny po sexuálním styku za proniknutí bakterie do těla. Následně dochází ke zduření lymfatických uzlin. V sekundárním stádiu infekce postupuje z uzlin do celého těla. Objevuje se vyrážka a syfilitická angína. Dále je provázena hepatitidou, horečkou a zánětem mozkových blan. Poslední fází, která přerušuje latentní stádium po 10-20 letech je terciární a probíhá bez komplikací. V tomto stádiu je pacient nejméně nakažlivý po své okolí. Zánět poškozuje kosti a nervovou tkáň (17, 18).

Pokud se syfilis prokáže, tak je třeba klást důraz na prevenci zejména v sexuálním životě. Základem léčby je včasná diagnóza. Tu zajišťuje dermatovenerolog, který při zjištění nemoci aplikuje antibiotika penicilin nebo tetracyklin. Po prodělání syfilisu jsou pacienti pravidelně sledováni lékařem. Pacientovi je po dobu léčby vyšetřována krev klinickými a sérologickými metodami. Pokud jsou výsledky po dvou letech od залéčení negativní, může být pacient vyřazen z evidence (17, 18).

Laboratorní vyšetření

Primárním vyšetřením je klinický obraz a anamnéza. Následuje nepřímá diagnostika – sérologické vyšetření protilátek. Zde se zahrnují netreponemové testy – průkaz nespecifických antikardiolipidových protilátek a treponemové testy – průkaz specifických protilátek proti antigenům *Treponema Pallidum*. Mezi přímou diagnostiku patří vyšetření v zástinovém mikroskopu, PCR, přímý imunofluorescenční průkaz antigenu a histopatologické vyšetření (26).

1.3.6 Parvovirus B19

Klinické projevy

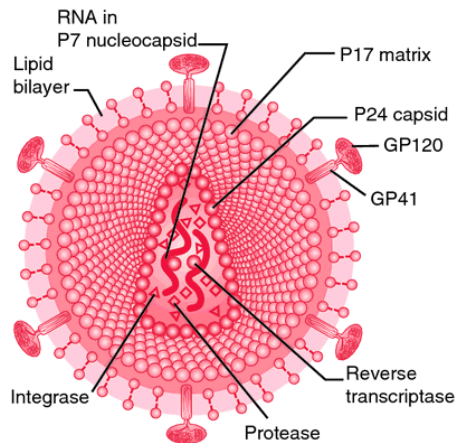
Parvovirus B19 je virus, který vyvolává infekce po celém světě. Nejvíce k nákaze dochází v dětství. Přenáší se kapénkami respiračních sekretů nebo nosokomiální cestou. Nejčastější formou této nemoci je *erythema infectiosum* známá také pod názvem pátá nemoc. Onemocnění se projevuje parvovirémií, horečkou a příznaky podobné chřipce (27).

Původce

Parvovirinae jsou viry z rodiny Parvoviridae, které jsou schopné infikovat obratlovce. Parvovirinae se dělí do tří rodů dle transkripčních map. Rod Dependovirus a Erythrovirus jsou infikováni lidmi (28).

Virus a jeho stavba

Tento virus má jednoduchou strukturu složenou ze dvou proteinů a lineární jednovláknové molekuly DNA. Virové částice mají průměr 22 až 24 nm. Virion je obsažen z 60 kopií kapsomer. Díky nepřítomnosti lipidové obálky je virus B19 odolný vůči fyzické inaktivaci (28).



Obr. 6 - Stavba viru Parvoviru B19_(47)

Patogeneze a prevence

Životní cyklus parvoviru B19 zahrnuje vazbu viru na receptory hostitelských buněk, internalizaci, translokaci genomu do hostitelského jádra, replikaci DNA, transkripci RNA, sestavení kapsid a balení genomů, a nakonec buněčnou lýzu s uvolněním zralých virionů. Vyjimku tvoří jedinci, kteří geneticky neobsahují antigen P, ti jsou přirozeně rezistentní vůči infekci B19. Právě P antigen je exprimován na erytroidních progenitorů.

Infekce se nejčastěji přenáší cestou dýchací, krví parenterálně a vertikálně od matky k plodu. Zároveň byl B19 specifická DNA detekována v respiračních sekretech v době virémie (28).

Laboratorní vyšetření

Virus B19 je nejčastěji detekován izolací virové DNA přímou hybridizací nebo metodou PCR. Přímá hybridizace využívá virovou DNA v plné délce. Rovněž se provádí detekce protilátek a DNA viru, jehož kultivace na standardně užívaných tkáních je obtížná. Specifické protilátky se prokazují testy ELISA. Pro přítomnost infekce je typická přítomnost protilátek IgM (27, 28).

1.3.7 Vyšetřování infekčních markerů

V současnosti se jedná o stále aktuální oblast medicíny, která tvoří podstatnou část u vyšetření odebrané krve od jejího dárce (transfuzní služba) ev. u pacientů (infekční kliniky). Na základě Vyhlášky viz výše, je povinné u každého odběru vyšetřit infekční nemoci z důvodu snížení rizika přenosu a nákazy infekčními onemocněními. Dnes se používány velice citlivé a specifické testy k vyšetření a průkazu infekce u dárce krve nebo krevních složek, stejně tak jako u pacientů. U dárců krve z toho důvodu, že významnou cestou přenosu je v budoucnu použitý transfuzní přípravek. Nyní se k vyšetření využívají kvalitní sérologické metody, které pracují na bázi screeningových testů (3).

V současné době používané testy využívají následujících principů:

- *Nepřímého průkazu přítomnosti infekčního agens v krvi dárce založeného na průkazu specifických protilátek*
- *Imunochemické metody založeny na reakci antigenních determinant s vazebným místem protilátky, umožňující stanovit antigeny infekčního původu nebo specifické protilátky vzniklé na základě jejich imunologického podnětu*

- *Imunoanalytické metody, které patří do skupiny imunochemických metod a které dosahují zvýšené citlivosti využitím značení a v závěru reakce rovněž detekcí jedné ze značených, reagujících složek (antigenu nebo protilátky)*
- *Značenou složkou může být enzym (enzymová imunoanalýza), fluorescenční nebo chemiluminiscenční látka, vhodný radioizotop_(2, s. 125)*

Základními parametry, kterými lze diagnostikovat infekci je přítomnost protilátek či antigenů na povrchu viru. Navíc i pomocí tříd imunoglobulinů jsme schopni určit posun nemoci, zda-li se jedná o akutní nebo chronickou fázi. (9, s. 52,53)

HAV

- Pokud se protilátky proti viru nacházejí ve třídě IgM – akutní HAV
- Ve třídě IgG – HAV už člověk prodělal a doporučuje se vakcinace_(9, s. 52,53)

HBV – akutní

- Akutní infekci lze stanovit sérologickým vyšetřením, ale v určité fázi může nastat shodnost nálezů mezi akutní a chronickou fází
- Přítomnost povrchového antigenu HBsAg vykazuje pozitivitu HBV a zároveň se tvoří protilátky proti jádrovému antigenu HBeAg třídy IgM
- Pokud je nález sekrečního antigenu HBeAg, jedná se o přechod infekce do chronicity a tento antigen přetrvává na povrchu viru i více jak 10 týdnů
- Nález anti-HBs protilátek znamená úzdravu z akutní fáze a pokud je titer nad 100IU/ ml může nastat i trvalá imunita
- V případě diagnostického okna je jediným záchytným bodem pro určení akutní fáze přítomnost anti-HBe protilátek_(9, s. 52,53)

HBV – chronická

- Známkou úspěšné vakcinace je přítomnost anti-HBs protilátky
- Pokud je HBsAg přítomný déle jak 6 měsíců, vykazuje to chronicitu
- Stanovení HBV DNA pomocí real-time PCR umožňuje stanovení i velmi nízkých virémií 10-100 IU/ ml (9, s. 52,53)

HCV

- Ke stanovení protilátek anti-HCV se využívá metoda EIA
- Bohužel běžné vyšetření anti-HCV neumožňuje odlišení od akutní a chronické fáze
- Pomocí molekulární diagnostiky HCV RNA v krvi umožňuje metoda real-time PCR (9, s. 52,53)

Pro vyšetření infekčních markerů se používá sérum nebo plazma dárce. Nesrážlivá krev se odebírá do zkumavek s protisrážlivým přípravkem nejlépe EDTA (chelatonan) nebo heparin. Daný vzorek musí před vyšetřením splňovat několik kritérií, jako je dokumentace, transport a skladování.

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce srovnání metod serologického a NAT vyšetření infekčních markerů u dárců krve v těchto parametrech: HBsAg/HBV DNA; a-HCV/HCV RNA; a-HIV1+2, Ag p24/HIV RNA; syphilis; HAV RNA; PVB19 DNA v ÚVN Praha. V teoretické části bude popsán zákonný podklad pro vyšetřování infekčních markerů u dárců krve, doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČSL JEP s popisem jednotlivých infekčních markerů. Metodická část bude zahrnovat vlastní popis metod vyšetřování. Výsledkem bakalářské práce bude grafické a statistické vyhodnocení infekčnosti dárců v ÚVN za rok 2016 a 2017, porovnání reaktivních výsledků z laboratoře s výsledky konfirmačního vyšetření z Národních referenčních laboratoří Státního zdravotního ústavu v Praze.

3 METODIKA

Tato část práce zahrnuje popis vyšetření infekčních markerů dárců krve dvěma metodami za použití daných analyzátorů na OHKT na pracovišti ÚVN v Praze. Jednotlivé údaje vycházejí ze směrnic ÚVN a SOP oddělení a popisují přehled laboratorních postupů na tomto pracovišti. Zároveň udávají podmínky pro vyřazení či nevyřazení transfuzních přípravků a dárců krve. Základní normou je vyhláška MZ ČR č. 143/2008 Sb.

3.1 Serologická vyšetření (a-HCV, syfilis, HBsAg, a-HIV1+2, Agp24)

3.1.1 Primární vzorky

Pro vyšetření infekčních markerů jsou používány tyto typy zkumavek:

Greiner Bio-One typ Vacuette antikoagulant K2EDTA se separačním gelem
Kód: 456011

Greiner Bio-One typ Vacuette Z No Additive Kód: 454088

základní matix: plasma

Centrifugace: Vzorky se separačním gelem stáčeny na oddělení po příjmu z výrobní části ev. z plasmaferetických center - dle doporučení výrobce Greiner Bio-One 10 min/3500ot. V chlazenyých (NAT zkumavky) a nechlazenyých centrifugách (serologické a imunohematologické metody) (56).

3.2 Serologické vyšetření

2 Pracovní prostředky, materiál

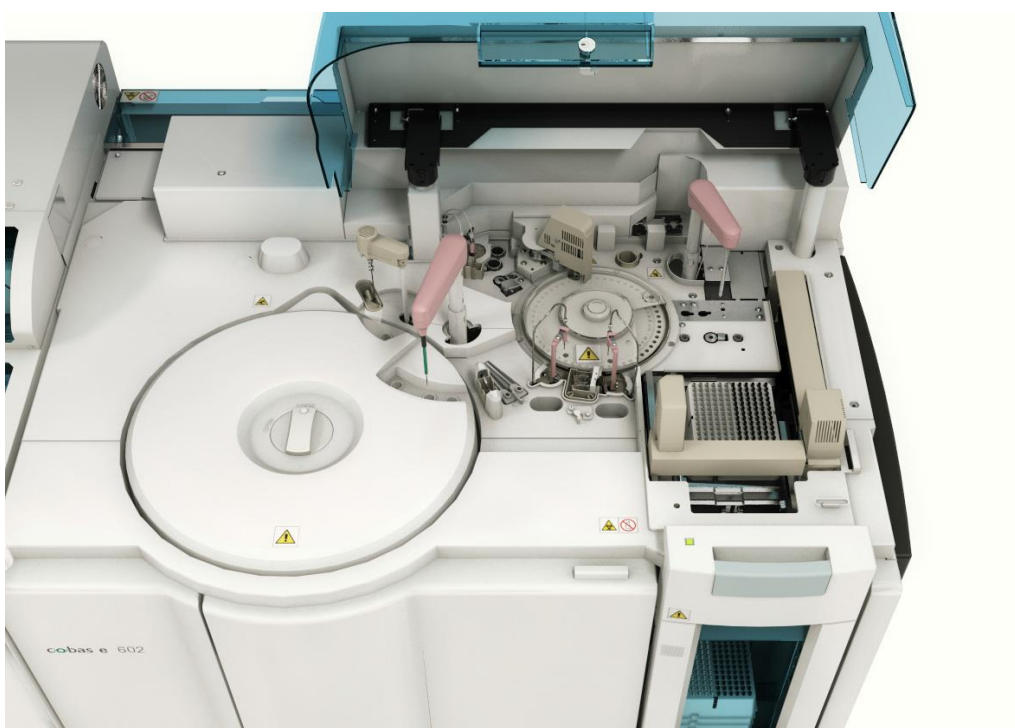
3.2.1 2.1 Zařízení:

Imunochemický analyzátor cobas® 8000 Roche moduly AU1-AU2-AU3 (3xmodul e602) (56)

Moduly:	výr.č.:
<i>cobas core:</i>	1502-16
<i>cobas e602 I</i>	1502-15
<i>cobas e602 II</i>	1502-17
<i>cobas e602 III</i>	15002-18
<i>cobas link:</i>	14F1-16

Imunochemický analyzátor cobas® 8000 Roche moduly AU4-AU5-AU6 (3xmodul e602) (56)

Moduly:	výr.č.:
<i>cobas core:</i>	1164-05
<i>cobas e602 I</i>	1162-17
<i>cobas e602 II</i>	1170-03
<i>cobas e602 III</i>	1172-04
<i>cobas link:</i>	3143YH91



Obr. 7 a 8: modul cobas® e602 pohled ze strany (1) a pohled na pracovní plochu modulu (2) (56)

Reagencie:

1/ kalibrátory pro jednotlivé reagenční sety – součást packu reagencie

2/ kontrolní materiály:

- Accurun®1 serie 5600: pro stanovení anti-HIV-1 a 2, HBsAg, a-HCV
(externí kontroly kvality – měřeno 1x/týdně)
- Accurun® 155 serie 2000: pro stanovení IgG proti *Treponema palladium*
(externí kontroly kvality – měřeno každý týden)
- PreciControl (PC) anti-HCV, PC HBsAg, PC HIV, PC Syphilis (interní
kontroly kvality – měřeno každý den)

3/ reagenční roztoky a diluenty:

- CleanCell M
- ProCell M
- ProClean M
- ProbeWash
- ISECleaning Solution
- Combirack Elecmod E170
- HbsAg GENII
- HIV combi PT
- A-HCV II
- Syphilis

2.3 Spotřební materiál:

- AssayTip/Assay Cup
- Wasteliner M Elecsys®Modular

- **Mikrozkumavka Hitachi caps**

3 Vlastní pracovní postup

3.2.2 3.1 Použité metody a jejich názvy:

- a- HCV
- HBsAg
- HIV (a-HIV 1+2, Ag p24)
- Syphilis

(29)

Princip testu: elektrochemiluminiscenční imunostanovení ECLIA .

Principem je sendvičová imunochemická analýza s využitím přímé chemiluminiscence. Reagencie obsahují biotinylovanou protilátku a také protilátku značenou rutheniovým komplexem, které reagují se stanovovaným antigenem vzniku sendvičového komplexu. Komplex se váže na mikročástice (pevná fáze) potažené streptavidinem prostřednictvím interakce streptavidin – biotin. Mikročástice jsou zachyceny magnetickým polem na povrchu elektrody, kde přivedené napětí vyvolává chemiluminiscenci. Signál je vyhodnocen SW analyzátoru v jednotkách COI (20).

3.2.3 Vyšetření HBsAg, anti-HCV, HIV a syfilis

Vyšetření HBsAg

Vyšetření je prováděno při každém odběru dárce (každé odebrané heterologní transfuzní jednotky) v rámci prevence přenosu hepatitidy typu B, kitem HBsAg GENII. Jedná se o kvantitativní stanovení povrchového antigenu viru hepatitidy B (HBsAg) v lidském séru a plazmě. Kit používá pro stanovení HBsAg monoklonální a polyklonální protilátky proti HBs (myší a ovčí).

Sendvičový princip.

Celková doba stanovení: 18 minut.

- 1. inkubace: 50 μ L vzorku, 2 biotinylované monoklonální protilátky proti HBsAg a směs monoklonální protilátky proti HBsAg a polyklonální

protilátky proti HBsAg značené rutheniovým komplexem) reagují a vytváří sendvičový komplex.

- 2. inkubace: Po přidání mikročastic potažených streptavidinem se komplex váže na pevnou fázi prostřednictvím interakce mezi biotinem a streptavidinem.
- Reakční směs je nasáta do měřicí cely, kde jsou mikročástice s navázanými komplexy zachyceny prostřednictvím magnetu. Nenavázané složky jsou odstraněny roztokem ProCell/ProCell M. Přivedené napětí na pracovní elektrodě vyvolá chemiluminiscenční emisi fotonů, která je změřena fotonásobičem.
- Výsledky stanovuje automaticky software analyzátoru porovnáním elektrochemiluminiscenčního signálu, získaného z produktu reakce vzorku se signálem hodnoty cut-off získané dříve kalibrací (32).

Vyšetření anti-HCV

Vyšetření se provádí při každém odběru dárce (každé odebrané heterologní transfuzní jednotky) v rámci prevence přenosu hepatitidy typu C, kitem Anti-HCV II. Jedná se o kvalitativní detekci protilátek proti viru hepatitidy C (anti-HCV) v lidském séru a plazmě. Stanovení Anti-HCV II používá peptidy a rekombinantní antigeny představující dřeňové, NS3 a NS4 proteiny pro měření protilátek proti HCV.

Princip testu

Sendvičový princip.

Celková doba stanovení: 18 minut.

- 1. inkubace: 50 μ L vzorku, 55 μ L reagentie obsahující biotinylované HCV-specifické antigeny a 55 μ L reagentie obsahující HCV-specifické antigeny značené rutheniovým komplexem) reagují a vytváří sendvičový komplex.
- 2. inkubace: Po přidání mikročastic potažených streptavidinem se

komplex váže na pevnou fázi prostřednictvím interakce mezi biotinem a streptavidinem.

- Reakční směs je nasáta do měřicí cely, kde jsou mikročástice s navázanými komplexy zachyceny prostřednictvím magnetu. Nenavázané složky jsou odstraněny roztokem ProCell/ProCell M. Přivedené napětí na pracovní elektrodě vyvolá chemiluminiscenční emisi fotonů, která je změřena fotonásobičem.
- Výsledky stanovuje automaticky software analyzátoru porovnáním elektrochemiluminiscenčního signálu, získaného z produktu reakce vzorku se signálem hodnoty cut-off získané dříve kalibrací (33).

Vyšetření HIV

Vyšetření anti-HIV 1/2 + antigen p24 se provádí při každém odběru dárce (u každé odebrané heterologní transfuzní jednotky) k zamezení rizika přenosu AIDS transfuzí krve.

Stanovení Elecsys HIV combi PT umožňuje současně detekci HIV-1 p24 antigenu a protilátek proti HIV-1 a HIV-2 v rámci jednoho měření. Stanovení využívá k měření specifických protilátek proti HIV rekombinantní antigeny, odvozené z *pol-* a *env-* oblastí HIV-1 (včetně skupiny O) a HIV-2.

Pro detekci antigenu HIV-1 p24 se používají specifické monoklonální protilátky. Opakovaně reaktivní vzorky musí být potvrzovány podle doporučených konfirmačních algoritmů. Konfirmační testy zahrnují Western Blot a HIV RNA testy.

Princip testu

Sendvičový princip. Celková doba stanovení: 27 minut.

- 1. inkubace: Předúprava 40 μ L vzorku detergentem.
- 2. inkubace: Biotinylované monoklonální protilátky proti p24/HIV-specifickým rekombinantním antigenům/HIV-specifickým peptidům a monoklonální protilátky proti p24/HIV-specifickým antigenům/HIV-specifickým peptidům, značené rutheniovým

komplexema) reagují za tvorby sendvičového komplexu.

- 3. inkubace: Po přidání mikročastic, potažených streptavidinem, se komplex váže na pevnou fázi prostřednictvím interakce mezi biotinem a streptavidinem.

- Reakční směs je nasáta do měřicí cely, kde jsou mikročastice s navázanými komplexy zachyceny prostřednictvím magnetu.

Nenavázané složky jsou odstraněny roztokem ProCell/ProCell M.

Přivedené napětí na pracovní elektrodě vyvolá chemiluminiscenční emisi fotonů, která je změřena fotonásobičem (34).

Vyšetření na syfilis

Vyšetření se provádí při každém odběru dárce (každé odebrané heterologní transfuzní jednotky), v rámci prevence přenosu syphilis. Vyšetření se provádí pomocí kitu Syphilis. Jedná se o elektrochemiluminiscenční imunostanovení pro in vitro kvalitativní měření celkových protilátek proti *Treponema pallidum* v lidském séru či plazmě (20).

Princip testu

Sendvičový princip.

Celková doba stanovení: 18 minut.

- 1. inkubace: 10 µL vzorku, biotinylované TP-specifické rekombinantní antigeny a TP-specifické rekombinantní antigeny, značené rutheniovým komplexema) reagují a vytváří sendvičový komplex.

- 2. inkubace: Po přidání mikročastic potažených streptavidinem se komplex váže na pevnou fázi prostřednictvím interakce mezi biotinem a streptavidinem.

- Reakční směs je nasáta do měřicí cely, kde jsou mikročastice s navázanými komplexy zachyceny prostřednictvím magnetu.

Nenavázané složky jsou odstraněny roztokem ProCell/ProCell M.

Přivedené napětí na pracovní elektrodě vyvolá chemiluminiscenční emisi fotonů, která je změřena fotonásobičem.

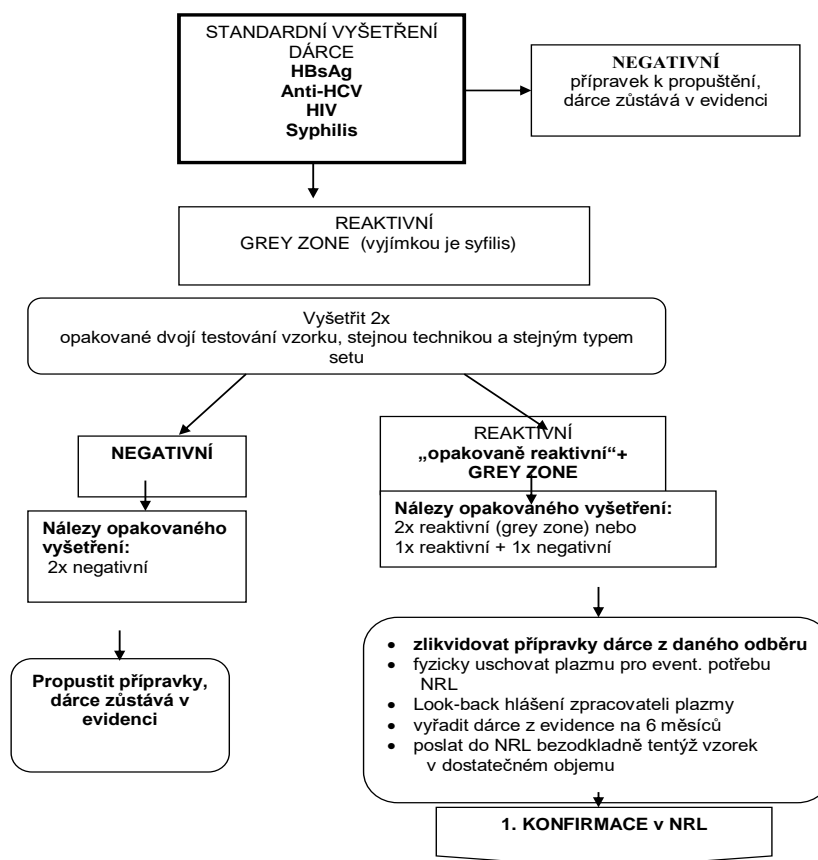
- Výsledky stanovuje automaticky software analyzátoru porovnáním elektrochemiluminiscenčního signálu, získaného z produktu reakce vzorku se signálem hodnoty cut-off získané dříve kalibrací (35).

Možné výsledky serologického testování

1/NEGATIVNÍ: výsledky do 0,89 COI

- 2/GREY ZONE: výsledek 0,9-0,99 COI v analyzátoru se zaznamená jako „boarder“, do LIS přechází jako GREY, je třeba postupovat jako při měření reaktivního výsledku tj. vzorek měřit na 2R. Syphilis grey zone nemá, výsledek této metody je pouze reaktivní-negativní
- 3/REAKTIVNÍ výsledek 1,0 a vyšší (29)

Postup při interpretaci výsledků (51)



3.3 Stanovení nukleové kyseliny infekčních markerů metodou NAT

2 Pracovní prostředky, materiál

2.1 Zařízení

Systém cobas® s 201 (Roche):

- HAMILTON MICROLAB® STAR/STARlet IVD
- COBAS® AmpliPrep.
- COBAS® TaqMan®.
- Automatické řízení dat pomocí softwaru pro tvorbu směsí a řízení dat (PDM)



Obr. 9 - modul Hamilton STAR (56)



Obr. 10 - modul Ampliprep a TaqMan (56)

3.4 2.2 Reagencie a roztoky pro stanovení HBV DNA, HCV RNA, HIV RNA

Reagencie:

1/cobas® TaqScreen MPX v2.0:

- MPX CS1 (MPX kazeta s čínidly pro magnetické skleněné částice)
- MPX CS2 (MPX kazeta s lytickým čínidlem)
- MPX CS3 (MPX multičínidlová kazeta)
- MPX CS4 (kazeta s čínidly specifickými pro test MPX) (30)

cobas® TaqScreen MPX Control Kit:

- MPX M(+)_C, v2.0 – Multipozitivní kontrola (kontrola cobas® TaqScreen MPX Multi-Positive Control, v2.0)
 - (HIV-1 M Pozitivní kontrola)
 - (HBV Pozitivní kontrola)
 - (HCV Pozitivní kontrola)
- MPX O(+)_C, v2.0 - (Pozitivní kontrola cobas® TaqScreen MPX HIV-1 O)
- MPX 2(+)_C, v2.0 - (Pozitivní kontrola cobas® TaqScreen MPX HIV-2)
- MPX (-)_C, v2.0 - (Negativní kontrola cobas® TaqScreen MPX – TS(-) C)

cobas® TaqScreen Wash Reagent (promývací čínidlo) (30)

3.5 2.3 Spotřební materiál

- Jednotky pro zpracování vzorku (SPU)
- Vstupní zkumavky pro vzorky (S-zkumavky) s klipy s čárovým kódem
- K-tips
- Box s K-zkumavkami v počtu 12 x 96

- Vysokoobjemové špičky CO-RE (1000 µl), filtr

3.6 2.4. *primární vzorky*

Matrix: plasma

Greiner Bio-One typ Vacuette K2EDTA se separačním gelem **Kód: 456011**

Greiner Bio-One typ Vacuette Z No Additive **Kód: 454088**

Centrifugace: Vzorky se separačním gelem stáčeny - dle doporučení výrobce Greiner Bio-One 10 min/3500ot/4°C v chlazené centrifuze, uskladněny po centrifugaci v lednici (30).

3 PRINCIP STANOVENÍ

Test cobas® TaqScreen MPX je kvalitativní multiplexní test, který umožňuje screening a současnou detekci HIV-1 RNA skupin M a O, HIV-2 RNA, HCV RNA a HBV DNA v infikovaných smíchaných a jednotlivých dárcovských vzorcích plazmy. Test cobas® TaqScreen MPX používá obecnou techniku přípravy nukleové kyseliny na zařízení COBAS® AmpliPrep. HIV-1 RNA skupin M a O, HIV-2 RNA, HCV RNA a HBV DNA jsou amplifikovány a detekovány pomocí automatizované, v reálném čase probíhající polymerázové řetězové reakce (PCR) na analyzátoru COBAS® TaqMan®. Test zahrnuje vnitřní kontrolu pro monitorování výkonnosti testu při každém jednotlivém testu, a také enzym AmpErase (uracil-N-glykosylázu) k omezení potenciální kontaminace předchozím amplifikovaným materiálem (amplikon) (30).

Automatická tvorba směsí vzorků a pipetování pomocí pipetoru Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD

Doplňkový pipetor Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD automatizuje pipetování směsí vzorků a vzorky jednotlivých dárců, přenos alikvotních podílů na destičky s hlubokými jamkami (doplňek) a pipetování kontrol testů jako součást systému **cobas s 201**. Systém **cobas s 201** se používá pro testování směsí vzorků dárců a rozlišení reaktivních směsí k identifikaci jednotlivých reaktivních vzorků dárců. Systém **cobas s 201** je navržen pro dávkové zpracování vzorků. Dávka je definována jako soubor vzorků a kontrol, které jsou společně pipetovány, extrahovány, amplifikovány a detekovány. Jakmile pipetor Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD dokončí pipetování dávky, dávka je přenesena do zařízení COBAS® AmpliPrep k dalšímu kroku zpracování. Manuální napipetované vzorky mohou být umístěny přímo do zařízení COBAS® AmpliPrep bez předchozího použití pipetoru Hamilton MICROLAB STAR/STARlet IVD (36).

Automatická příprava vzorků pomocí zařízení COBAS® AmpliPrep

Nukleové kyseliny cílových virů a přidané molekuly Armored RNA vnitřní kontroly (IC) (které slouží jako procesní kontrola přípravy vzorku a amplifikace /detekce) jsou zpracovány zároveň. Multiplexní test **cobas®** TaqScreen MPX, v2.0 obsahuje činidla, která provádí pět sekvenčních kroků na zařízení COBAS® AmpliPrep. Roztok proteinázy rozpouští proteiny k podpoře štěpení, deaktivuje nukleázy a usnadňuje uvolnění RNA a DNA z virových částic. Přidání činidla pro lýzu ke vzorku má za důsledek štěpení virů a aktivaci nukleázy díky denaturaci proteinů. Dochází k uvolňování RNA a DNA a zároveň ochraně před nukleázami. Uvolněné nukleové kyseliny se váží na rosolový povrch přidaných magnetických skleněných částic. To se děje hlavně díky čistému kladnému náboji na povrchu skleněných částic a čistého záporného náboje nukleových kyselin za koncentrace chaotropní soli a iontové síly štěpící reakce. Promývací činidlo odstraňuje nenavázané látky a nečistoty, jako jsou denaturované bílkoviny, buněčný odpad a potenciální PCR inhibitory (například hemoglobin, atd.) a snižuje koncentraci soli. Vyčištěné nukleové kyseliny se uvolní z magnetických skleněných částic při zvýšené teplotě elučním pufrem (36).

Automatická amplifikace nukleové kyseliny pomocí analyzátoru cobas® TaqMan®

Po izolaci purifikovaných nukleových kyselin z lidské plazmy během automatické přípravy vzorku se používá Master mix testu **cobas®** TaqScreen MPX, v2.0 (MPX2 MMX) pro amplifikaci, detekci a rozlišení HIV (HIV-1 skupiny M, HIV-1 skupiny O a HIV-2) a RNA HCV, DNA HBV a RNA vnitřní kontroly (IC). Po aktivaci umožňuje Master Mix pro test **cobas®** TaqScreen MPX, v2.0 reverzní transkripci (pro cílové RNA) přidávkem octanu manganatého, po které následuje PCR amplifikace vysoce chráněných oblastí RNA HIV-1 (skupiny M, HIV-1 skupiny O), HIV-2 a HCV, DNA HBV a RNA IC RNA pomocí specifických

primerů. Souběžná detekce amplifikované nukleové kyseliny je prováděna vytvářením fluorescentních signálů z 5'-nukleolytické degradace HIV-1 (skupin M a O), HIV-2, HCV, HBV a IC sond, které jsou také obsaženy v Master Mixu. Používají se čtyři fluorescenční barviva: jedno barvivo označuje IC sondu (vnitřní kontroly) a další tři barviva označují sondy HIV, HCV a HBV, což umožňuje nezávislou identifikaci cílových virů HIV, HCV a HBV a také vnitřní kontroly (IC). Všechny tři cíle HIV jsou identifikovány pomocí stejného barviva, proto nejsou od sebe rozlišeny (30).

Reverzní transkripce a PCR amplifikace Reverzní transkripce a amplifikace se provádí pomocí termostabilního rekombinantního enzymu, Z05D DNA Polymerázy. Za přítomnosti manganu (Mn^{2+}) vykazuje Z05D DNA Polymeráza reverzní transkriptázu a polymerázové aktivity DNA. Díky tomu může reverzní transkripce a PCR amplifikace probíhat v téže reakční směsi. PCR amplifikace je prováděna pomocí Z05D DNA Polymerázy, která prodlužuje navázané primery podél cílových templátů a vytváří dvouřetězcovou DNA (amplikon). Tento proces se několikrát opakuje a v každém cyklu se zdvojnásobuje množství amplikonové DNA. Amplifikace probíhá pouze v oblasti cílových genomů mezi primery; všechny genomy amplifikovány nejsou (30).

Selektivní amplifikace

Selektivní amplifikace cílové nukleové kyseliny ze vzorku se dosahuje v testu **cobas®** TaqScreen MPX, v2.0 použitím enzymu AmpErase (uracil-N-glycosylázy) a deoxyuridin-trifosfátu (dUTP). Enzym AmpErase rozpoznává a katalyzuje rozpad vláken DNA obsahujících deoxyuridin²⁴, ale přitom vynechává DNA obsahující deoxythymidin nebo RNA obsahující ribouridin.^{25,26} Deoxyuridin se v přírodní DNA nevyskytuje, ale v amplikonu je vždy přítomen vzhledem k tomu, že se v činidle Master Mix MPX2 používá deoxyuridin trifostát jako jeden z dNTP; proto je deoxyuridin obsažen pouze v amplikonu. V důsledku přítomnosti deoxyuridinu je kontaminovaný amplikon citlivý vůči destrukci

enzymem AmpErase před amplifikací cílové DNA. Jakýkoliv nespecifický produkt vytvořený po prvotní aktivaci činidla Master Mix pro test **cobas®** TaqScreen MPX, v2.0 manganem je zničen enzymem AmpErase. Enzym AmpErase, který je obsažený v činidle Master Mix MPX2, katalyzuje rozštěpení DNA obsahující deoxyuridin v místě deoxyuridinového zbytku rozevřením deoxyribozového řetězce v pozici C1. Když je řetězec amplikonové DNA v prvním tepelně cyklizačním kroku zahříván, štěpí se v poloze deoxyuridinu, čímž se DNA stává neamplifikovatelnou. Enzym AmpErase zůstává neaktivní po delší dobu, jakmile je vystaven teplotám nad 55°C, a proto nerozkládá cílový amplikon vzniklý po PCR reakci (30).

Automatická detekce produktů PCR v reálném čase pomocí analyzátoru cobas® TaqMan®

Během PCR amplifikace dochází při cyklování ve střídavě vysoké teplotě k denaturaci cílového a IC amplikonu a vzniká jednořetězcová DNA. Specifická detekce oligonukleotidových sond hybridizuje na jednořetězcovou formu amplifikované DNA. Amplifikace, hybridizace a detekce probíhají současně. Detekce produktů PCR27,28 Master Mix pro test **cobas®** TaqScreen MPX, v2.0 obsahuje detekční sondy, které jsou specifické pro nukleovou kyselinu HIV-1 (skupiny M a O), HIV-2, HCV, HBV nebo vnitřní kontroly (IC). Každá detekční sonda HIV, HCV, HBV a IC je označena 1) jedním ze čtyř oznamovacích fluorescenčních barviv a 2) dalším barvivem, které je tlumicí. Tři jedinečná oznamovací barviva jsou spojena se specifickými virovými sondami pro HIV, HCV nebo HBV a jsou měřena při stanovených vlnových délkách. Čtvrté oznamovací barvivo je spojeno se specifickou sondou vnitřní kontroly (IC) a je měřeno při jiné vlnové délce. Ve všech sondách se používá jeden typ tlumicího barviva. Tento systém umožňuje současnou detekci a rozlišení amplifikovaných cílů HIV, HCV a HBV a IC pomocí čtyř vlnových délek (37).

Před začátkem PCR amplifikace jsou sondy intaktní a oznamovací fluorescenční barvivo je potlačeno tlumícím barvivem kvůli vlivu Försterova přenosu energie. Během PCR amplifikace sonda hybridizuje na specifické jednořetězcové sekvence DNA a ve stejnou chvíli, kdy nastává amplifikace, jsou rozštěpeny 5' až 3' nukleázovou aktivitou Z05D DNA polymerázy. Jakmile jsou oznamovací a tlumící barviva tímto štěpením oddělena, dojde k odmaskování fluorescenční aktivity oznamovacího barviva. U každého PCR cyklu jsou generována zvýšená množství rozštěpených sond a kumulativní signál oznamovacího barviva se postupně zvyšuje. Detekce a rozlišení PCR produktů v reálném čase jsou prováděny měřením fluorescence uvolněných oznamovacích barviv, která představují virové cíle a vnitřní kontrolu (37).

Automatické řízení dat pomocí softwaru PDM

Software Roche PDM umožňuje uživateli prohlížet a vytvářet hlášení výsledků. Software Roche PDM označuje výsledky testů všech analýz jako nereaktivní, reaktivní nebo neplatné. Kromě vybírání a prohlížení výsledků PCR umožňuje software Roche PDM obsluze tisknout zprávy, hledat výsledky, přijímat výsledky darů a jako doplněk i odesílat výsledky do LIS (37).

3.6.1 Vyšetření HAV NAT, B19 NAT

Test cobas® TaqScreen DPX pro použití se systémem cobas® s 201 je test založený na amplifikaci nukleové kyseliny in vitro určený pro přímou kvantifikaci DNA genotypů 1, 2 a 3 parvoviru B19 a přímou kvalitativní detekci RNA genotypů I, II a III viru hepatitidy A (HAV) v lidské plazmě. Test cobas® TaqScreen DPX je určen ke kvantifikaci DNA parvoviru B19 a současně k detekci RNA viru hepatitidy A v plazmě určené pro další zpracování. Je možné použít plazmu z plné krve (získanou plazmu) nebo plazmu odebranou aferézou (dárcovskou plazmu).

Plazmu od všech dárců nebo ze směsí je možné testovat jako jednotlivé vzorky nebo ve směsích skládajících se z alikvotních podílů jednotlivých vzorků (20).

Principem testu cobas® TaqScreen DPX je duplexní test určený pro simultánní detekci parvoviru B19 a HAV v jednotlivých vzorcích nebo směsích plazmy humánního původu. Použití technologie s více barvivy umožňuje identifikaci každého virového cíle bez nutnosti dalšího rozlišovacího testování.

Navíc díky použití kvantifikačního standardu (QS) přímo zjištělného dle mezinárodního standardu B19 WHO27 nabízí test kvantifikační hodnotu (v IU/ml) cíle B19. S každým vzorkem je extrahován a amplifikován QS spolu s vnitřní kontrolou (IC) (pro cíl HAV). Test cobas® TaqScreen DPX používá obecnou techniku přípravy nukleové kyseliny na zařízení **cobas® AmpliPrep**. DNA parvoviru B19, RNA HAV, QS a IC jsou amplifikovány a detekovány pomocí automatizované, v reálném čase probíhající polymerázové řetězové reakce (PCR) na analyzátoru COBAS® TaqMan®. Rozlišení virového cíle, QS a IC se dosahuje použitím fluorescenčně značených sond, které jsou detekovány v oddělených kanálech analyzátoru **cobas®TaqMan®** (20).

Pro snížení potenciální kontaminace již amplifikovaným materiálem (amplikon) zahrnuje test enzym AmpErase (enzym uracil-N-glykosylázy). Vyšetření HAV NAT, B19 NAT je prováděno při každém odběru plné krve i plazmy (každé odebrané heterologní transfuzní jednotky), v rámci prevence přenosu hepatitidy typu A a parvoviru B19 (20).

Automatická příprava vzorků pomocí zařízení cobas® AmpliPrep

Simultánně se zpracovávají nukleové kyseliny ze vzorků a přidané molekuly IC Armored HAV RNA a molekuly B19V QS DNA zapouzdřené v obalu lambda (které slouží jako kontroly pro přípravu a amplifikaci/detekci/kvantifikaci

vzorků). Test **cobas**® TaqScreen DPX obsahuje činidla, která provádí pět sekvenčních kroků na zařízení **cobas**® AmpliPrep. Roztok proteinázy rozpouští proteiny k podpoře štěpení, deaktivuje nukleázy a usnadňuje uvolnění RNA a DNA z virových částic. Přidání činidla pro lýzu ke vzorku má za důsledek štěpení virů a aktivaci nukleázy díky denaturaci proteinů. Dochází k uvolňování RNA a DNA a zároveň ochraně před nukleázami. Uvolněné nukleové kyseliny se váží na rosolový povrch přidaných magnetických skleněných částic. To se děje hlavně díky čistému kladnému náboji na povrchu skleněných částic a čistému zápornému náboji nukleových kyselin za koncentrace chaotropní soli a iontové síly štěpicí reakce. Promývací činidlo odstraňuje nenavázané látky a nečistoty, jako jsou denaturované bílkoviny, buněčný odpad a potenciální PCR inhibitory (například hemoglobin, atd.) a snižuje koncentraci soli. Vyčištěné nukleové kyseliny se uvolní z magnetických skleněných částic při zvýšené teplotě elučním puforem (30).

Automatická amplifikace a detekce nukleové kyseliny pomocí analyzátoru cobas® TaqMan®

Po izolaci vyčištěných nukleových kyselin z lidské plazmy během automatické přípravy vzorku se používá **cobas**® TaqScreen DPX Master Mix (MMX) pro amplifikaci a detekci RNA HAV a RNA IC a amplifikaci a kvantifikaci DNA B19V a DNA QS. Po aktivaci umožňuje **cobas**® TaqScreen DPX Master Mix reverzní transkripci (pro cílové RNA) přidavkem octanu manganatého, po které následuje PCR amplifikace vysoce chráněných oblastí RNA HAV, RNA IC, DNA B19V a DNA QS pomocí specifických primerů. Amplikony se detekují hybridizací specifických oligonukleotidových sond. Amplifikace, hybridizace a detekce probíhají současně (30).

Reverzní transkripce a PCR amplifikace

Reverzní transkripce a amplifikace se provádí pomocí termostabilního rekombinantního enzymu, Z05 DNA Polymerázy. Za přítomnosti manganu (Mn^{2+}), vykazuje Z05 DNA Polymeráza reverzní transkriptázu a polymerázové

aktivity DNA. Díky tomu může reverzní transkripce a PCR amplifikace probíhat v téže reakční směsi. Během PCR amplifikace dochází při cyklování ve střídavě vysoké teplotě k denaturaci cílového a IC/QS amplikonu a vzniká jednořetězcová DNA. Z05 DNA Polymeráza prodlužuje napojené primery podél cílových templátů a vytváří dvouřetězcovou DNA (amplikon). Tento proces se několikrát opakuje a v každém cyklu se zdvojnásobuje množství amplikonu. Amplifikace probíhá pouze v oblasti cílových genomů mezi primery; všechny genomy amplifikovány nejsou (37).

Prevence kontaminace při přenosu

Kontaminaci amplikony při přenosu je zabráněno použitím enzymu AmpErase (uracil-N-glykosylázy) a deoxyuridin-trifosfátu (dUTP). Deoxyuridin se v přírodní DNA nevyskytuje, ale v amplikonu je vždy přítomen vzhledem k tomu, že se v Master Mixu používá jako jeden dNTP směs deoxyuridintrifosfátu s thymidintrifosfátem. Proto pouze amplikon obsahuje deoxyuridin. Enzym AmpErase rozpoznává a katalyzuje destrukci vláken DNA obsahujících deoxyuridin²⁸ rozevřením deoxyribozového řetězce v poloze C1, čímž se DNA stává neamplifikovatelnou. DNA obsahující deoxythymidin nebo RNA obsahující ribouridin^{29,30} není ovlivněná. Během počátečního kroku reverzní transkripce enzym AmpErase katalyzuje rozštěpení přenosového amplikonu v místě deoxyuridinového zbytku. Enzym AmpErase je neaktivní po delší dobu, jakmile je vystaven teplotám nad 55 °C, a proto nerozkládá nově vzniklý cílový amplikon.

Detekce produktů PCR^{31, 32}

Test **cobas**® TaqScreen DPX MMX obsahuje detekční sondy specifické pro nukleovou kyselinu HAV, IC, B19V nebo QS. Každá detekční sonda je označena

- 1) jedním ze čtyř oznamovacích fluorescenčních barviv a
- 2) dalším barvivem, které je tlumicí.

Každé specifické oznamovací barvivo je asociováno s odpovídajícím cílem a měřeno při definované vlnové délce. Ve všech sondách se používá jeden typ tlumicího barviva. Tento systém umožňuje detekci všech amplifikovaných cílů při různých vlnových délkách. Před začátkem PCR amplifikace jsou sondy intaktní a oznamovací fluorescenční barvivo je potlačeno tlumicím barvivem kvůli vlivu Försterova přenosu energie. Během PCR amplifikace sonda hybridizuje na specifické jednovláknové řetězce DNA a ve stejnou chvíli, kdy nastává amplifikace, jsou rozštěpeny 5' až 3' nukleázovou aktivitou Z05 DNA polymerázy. Jakmile jsou oznamovací a tlumicí barviva tímto štěpením oddělena, dojde k odmaskování fluorescenční aktivity oznamovacího barviva. U každého PCR cyklu jsou generována zvýšená množství rozštěpených sond a kumulativní signál oznamovacího barviva se postupně zvyšuje. Detekce PCR produktů v reálném čase je prováděna nezávislým měřením fluorescence uvolněných oznamovacích barviv, které představují virové cíle a dále IC a QS (37).

Řízení dat pomocí softwaru PDM

Software Roche PDM umožňuje uživateli prohlížet a vytvářet hlášení výsledků. Software Roche PDM označuje výsledky testu **cobas**® TaqScreen DPX jako nereaktivní, reaktivní nebo neplatné na cíl HAV a < mez, ≥ mez nebo neplatné na cíl B19V. Kromě vybírání a prohlížení výsledků PCR umožňuje software Roche PDM obsluhu tisknout zprávy, hledat výsledky, přijímat výsledky dárců a jako volitelně i odesílat výsledky do LIS (37).

Pracovní postup:

Použité pooly:

1. Metoda MPX (pool 96 nebo minipool 1)
2. Metoda DPX (pool 480 nebo minipool 1)

Principem poolování je tzv. alikvotace plasmy dárců., kdy např. u poolu 96 je použito 96 plasem dárců v jedné PCR zkumavce, která je následně vyšetřována jako tzv. pool.

Hodnocení

- Výsledky vzorků jsou platné, pouze pokud je platná celá dávka, která je obsahuje. U každého vzorku jsou měřeny dva parametry, jeden pro cílový virus a druhý pro vnitřní kontrolu.
- Konečné výsledky testu cobas® TaqScreen MPX v2.0 a DPX jsou vykazovány pomocí PDM softwaru následovně: (30)

Stav	Význam
<i>Complete</i> <i>Non-Reactive</i>	Dárce je nereaktivní u testovaného analytu(ů).
<i>Complete</i> <i>Reactive</i>	Dárce je reaktivní u testovaného analytu(ů).
<i>Complete</i> <i>Unresolved</i>	Doba životnosti vzorku dárce vypršela před přidělením stavu reaktivní nebo nereaktivní. U tohoto vzorku dárce nelze na systému provést dodatečné testování. (30)

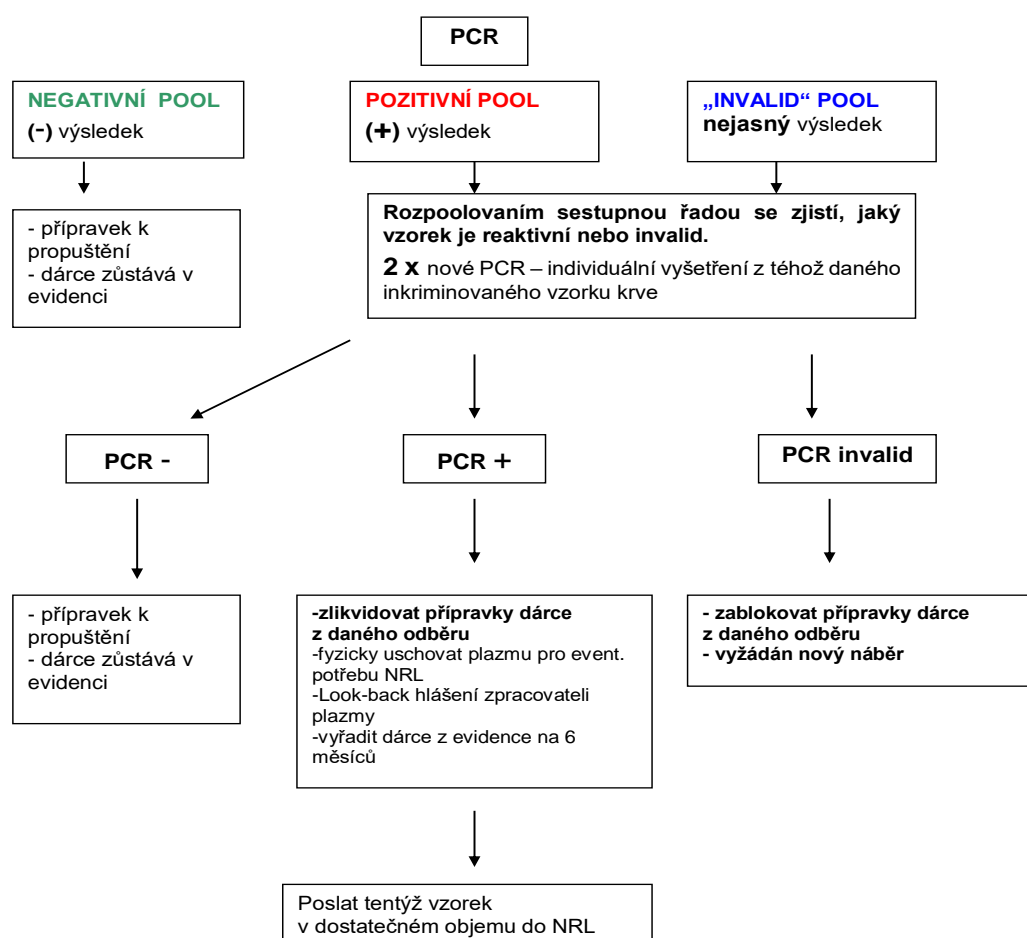
Dárci vyžadující dodatečné testování:

A/ dárcovské pooly, u jejichž směsi je stav „invalid“ nebo individuální stav vzorku dárce je „invalid“, mají přidělen stav „Repeat Needed“

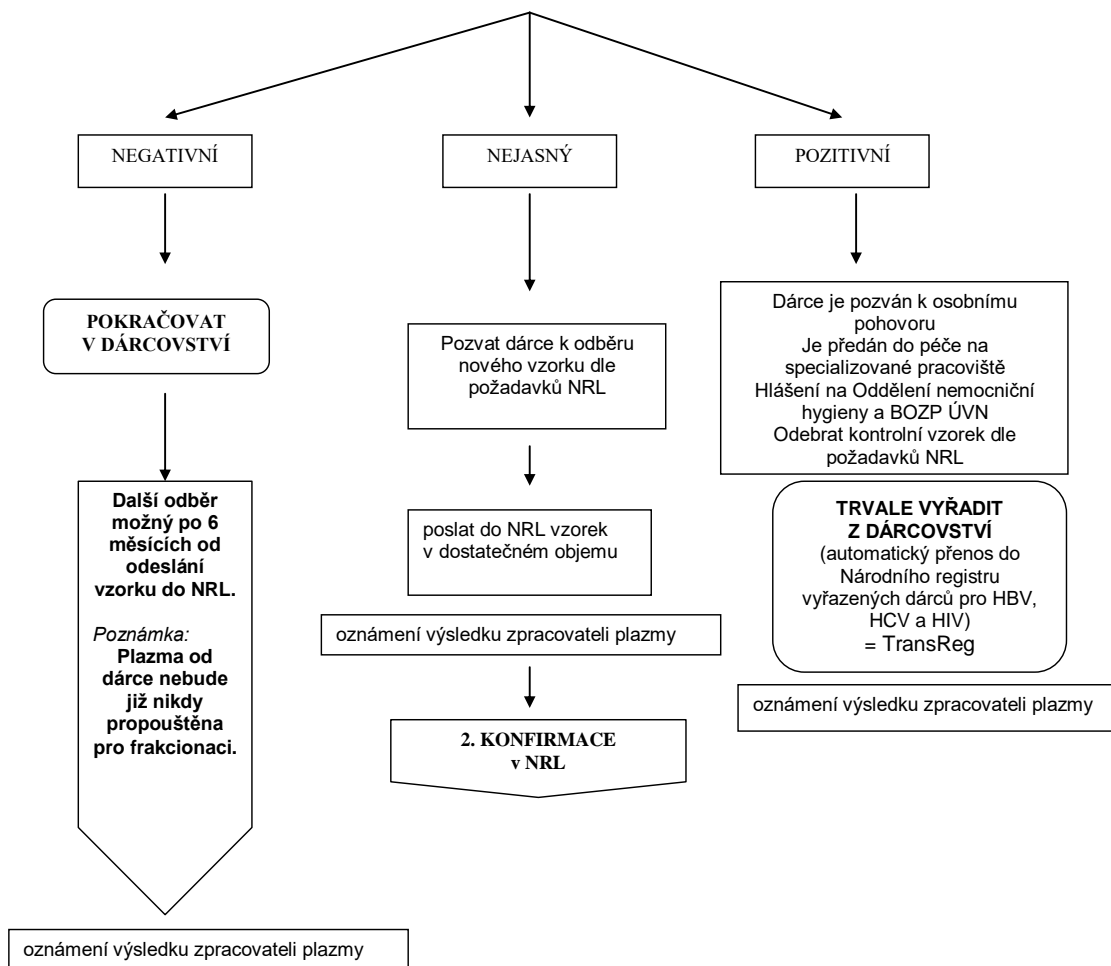
B/ dárcovské pooly zahrnuté v reaktivní směsi mají stav „Resolution Needed“ (30).

POSTUP PŘI ZJIŠTĚNÍ JINÉHO VÝSLEDKU NEŽ NEGATIVNÍHO

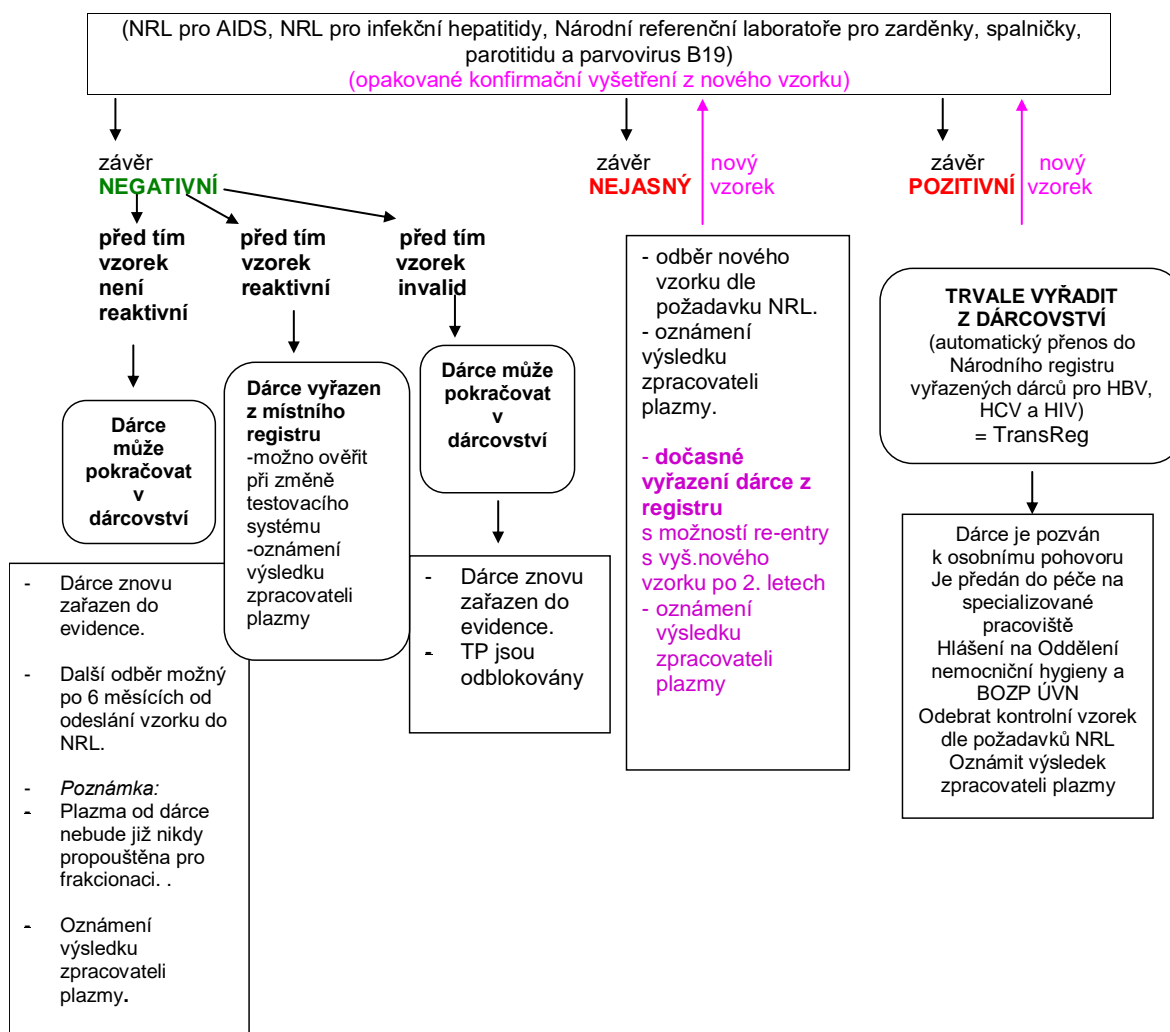
Schématický postup při vyšetření (52)



1. Konfirmace v NRL (53)



POSTUP U vzorků, které byly v laboratoři zjištěny jako reaktivní v sekci NAT (54)



4 VÝSLEDKY

Výsledky bakalářské práce obsahují přehled počtu dárců, kteří byli vyšetřeni na OHKT v ÚVN v Praze. Je uveden statistický přehled počtu jednotlivých serologických a NAT vyšetření za rok 2016 a 2017. Dále je zde zaznamenán přehled reaktivních a potvrzeně pozitivních dárců, jak z ÚVN, tak i z NRL za ty to dva roky.

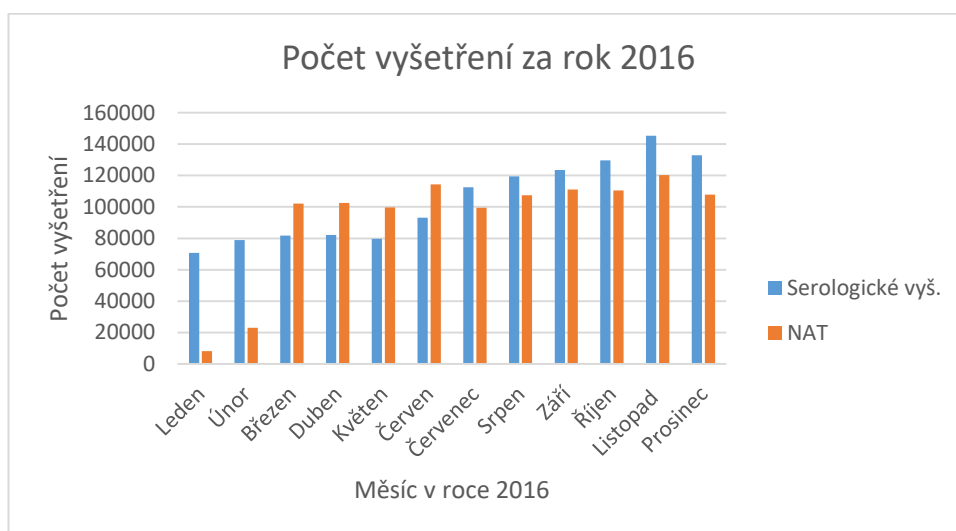
Tab. 2 - Počet jednotlivých vyšetření dárců z ÚVN za rok 2016

ÚVN/2016	Serologické vyšetření				NAT vyšetření				
	HBsAg	HCV	HIV	Syph	HBV	HCV	HIV	HAV	PVB19
Leden	1643	1643	1643	1643	1638	1638	1638	1638	1638
Únor	1738	1738	1738	1738	1735	1735	1735	1733	1733
Březen	1664	1664	1664	1664	1662	1662	1662	1662	1622
Duben	1722	1722	1722	1722	1720	1720	1720	1720	1720
Květen	1730	1730	1730	1730	1731	1731	1731	1731	1731
Červen	1686	1686	1686	1686	1686	1686	1686	1686	1686
Červenec	1137	1137	1137	1137	1137	1137	1137	1137	1137
Září	1755	1755	1755	1755	1326	1326	1326	1326	1326
Říjen	1503	1503	1503	1503	1750	1750	1750	1750	1750
Listopad	1690	1690	1690	1690	1503	1503	1503	1502	1502
Prosinec	1424	1424	1424	1424	1683	1683	1683	1683	1683
Celkem	17 692	17 692	17692	17 692	17 571	17 571	17 571	17 568	17 568

Do konce roku 2016 bylo v ÚVN otestováno pomocí NAT celkem 17 571 dárců krve a jejich složek, podrobnější popis níže (12, s. 8-15).

Tab. 3 - Přehled dárců odebraných na různých pracovištích ČR vyšetřené na ÚVN

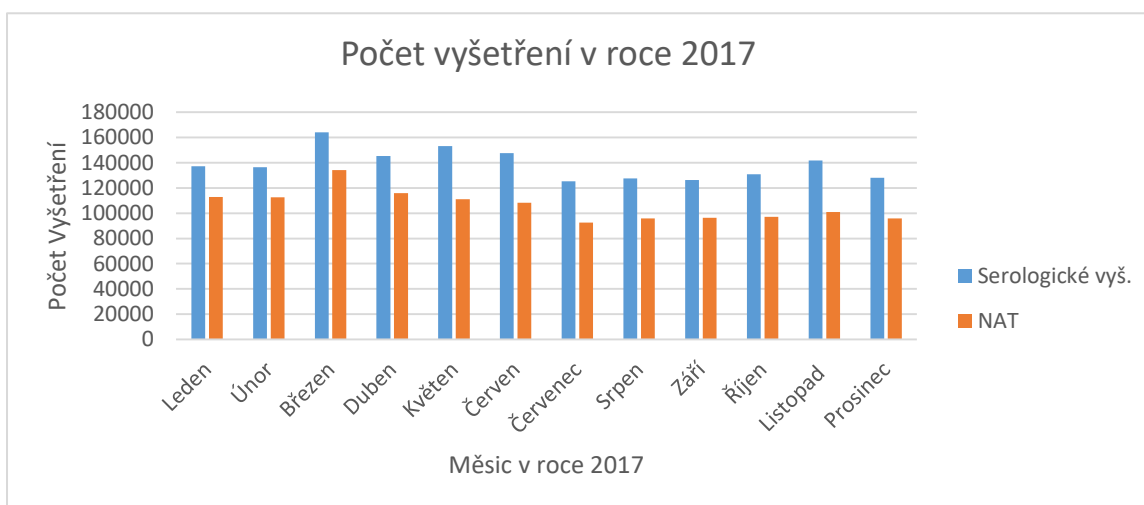
Počet vyšetření dárců z plazmacenter z ČR	Serologické vyšetření (HBsAg, HCV, HIV, Syph)		NAT (HBV, HCV, HIV, HAV, PV B19)	
	2016	2017	2016	2017
Leden	64 224	130 420	0	104 515
Únor	71 860	129 660	14 360	104 125
Březen	75 164	156 164	75 060	124 495
Duben	75 280	139 484	94 005	108 685
Květen	72 856	146 552	90 955	102 635
Červen	86 504	140 472	105 930	99 390
Červenec	108 040	120 132	93 800	86 110
Srpen	114 228	122 220	100 740	89 300
Září	116 600	119 144	102 365	87 410
Říjen	123 572	123 860	103 010	88 340
Listopad	138 668	134 664	111 945	92 040
Prosinec	137 156	122 168	100 785	88 415
Celkem	1 184 152	1 584 940	992 955	1 175 460



Obr. 11 - Počet serologického a NAT vyšetření za rok 2016

Tab. 4 - Počet jednotlivých vyšetření dárců z ÚVN za rok 2017

ÚVN/2016	Serologické vyšetření					NAT vyšetření			
	HBsAg	HCV	HIV	Syph	HBV	HCV	HIV	HAV	PVB19
Leden	1685	1685	1685	1685	1682	1682	1682	1682	1682
Únor	1710	1710	1710	1710	1710	1710	1710	1709	1709
Březen	1942	1942	1942	1942	1940	1940	1940	1940	1940
Duben	1452	1452	1452	1452	1453	1453	1453	1453	1453
Květen	1669	1669	1669	1669	1669	1669	1669	1669	1669
Červen	1773	1773	1773	1773	1774	1774	1774	1774	1774
Červenec	1300	1300	1300	1300	1298	1298	1298	1297	1297
Září	1767	1767	1767	1767	1766	1766	1766	1766	1766
Říjen	1750	1750	1750	1750	1749	1749	1749	1749	1749
Listopad	1765	1765	1765	1765	1764	1764	1764	1764	1764
Prosinec	1489	1489	1489	1489	1489	1489	1489	1489	1489
Celkem	18 302	18 302	18 302	18 302	18 294	18 294	18 294	18 292	18 292



Obr. 12 - Počet serologického a NAT vyšetření v roce 2017

Tab. 5 - Počet reaktivních dárců potvrzených v NRL jako pozitivní za rok 2016

Pohlaví	Muži Ženy		Pozitivní potvrzený
	Infekční nemoc		
Reaktivní syfilis	2	3	1 muž
Reaktivní HsAg	1	2	0
Reaktivní a-HCV	3	4	0
Reaktivní HIV1+2,Agp24	7	2	0
Reaktivní parvovirus B19	1		1 muž
Reaktivní HAV	0	0	0

Tab. 6 - Počet reaktivních dárců potvrzených v NRL jako pozitivní za rok 2017

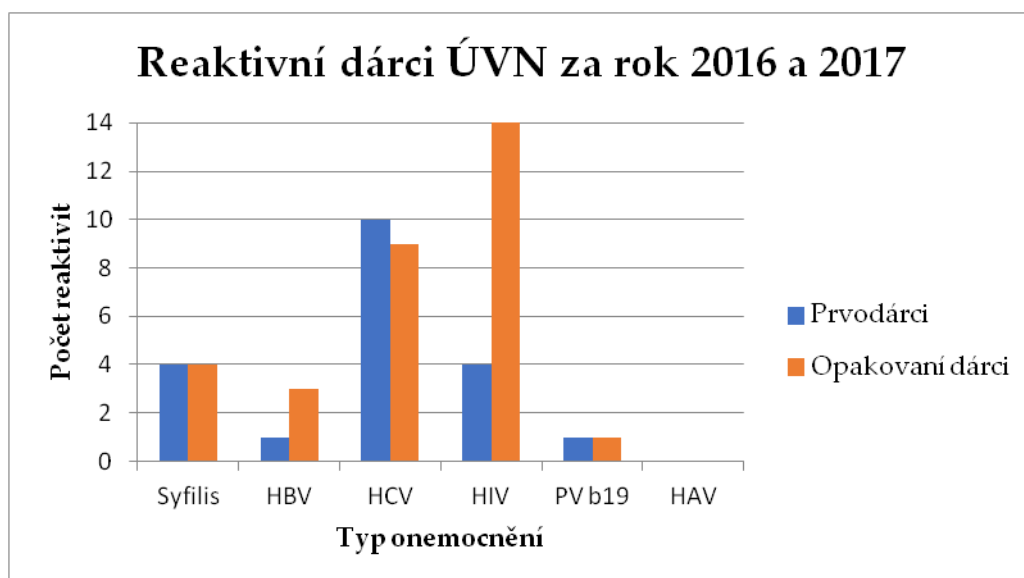
Pohlaví	Muži Ženy		Pozitivní potvrzený
	Infekční nemoc		
Reaktivní syfilis	4	0	1 muž
Reaktivní HsAg	1	0	0
Reaktivní a-HCV	8	4	0
Reaktivní HIV1+2,Agp24	9	0	0
Reaktivní parvovirus B19	1	0	1 muž
Reaktivní HAV	0	0	0

Tab. 7 - Statistika reaktivních dárců na ÚVN za rok 2016

Pohlaví Typ reaktivního onemocnění	Muži		Ženy		Dárci		Pozitivní konfirmasiovaný
	Muži	Ženy	Prvodárce	Opakovaný dárce	Prvodárce	Opakovaný dárce	
Reaktivní syfilis	2	3	3	2			1 muž
Reaktivní HsAg	1	2	-	3			0
Reaktivní a-HCV	3	4	4	3			0
Reaktivní HIV1+2, Ag p24	7	2	2	7			0
Reaktivní parvovirus B19	1	0	-	-			1 muž
Reaktivní HAV	0	0	-	-			0

Tab. 8 - Statistika reaktivních pacientů na ÚVN za rok 2017

Pohlaví Typ reaktivního onemocnění	Muži		Ženy		Dárci		Pozitivní konfirmasiovaný
	Muži	Ženy	Prvodárce	Opakovaný dárce	Prvodárce	Opakovaný dárce	
Reaktivní syfilis	4	0	1	2			1 muž
Reaktivní HsAg	1		1	-			0
Reaktivní a-HCV	8	4	6	6			0
Reaktivní HIV1+2,Agp24	9	0	2	7			0
Reaktivní parvovirus B19	1	0	-	-			1 muž
Reaktivní HAV	0	0	-	-			0



Obr. 13 - Statistika reaktivních dárců z ÚVN za rok 2016 a 2017

Tab. 9 - Počet NAT reactive only vzorků ze všech pracovišť, která jsou vyšetřována v ÚVN

Rok	Vyšetření	leden	únor	Březen	duben	květen	červen	červenec	srpen	září	říjen	listopad	prosinec	Celkem
2016	HBV	0	0	2	0	0	0	0	0	2	1	0	1	6
2016	HCV	0	0	0	4	2	7	0	1	2	3	3	1	23
2017	HBV	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3
2017	HCV	1	3	4	2	1	0	2	0	1	0	1	3	18
2018	HBV	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
2018	HCV	1	1	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	7

5 DISKUZE

Tématem práce je popis vyšetřování infekčních markerů u dárců krve na OHKT v ÚVN v Praze a problematika s tím spojená včetně statistické analýzy. V současné době stále aktuální téma, které reaguje na to, že přetrvávají rizika přenosu infekce transfuzními přípravky. Dle odhadů Světové zdravotnické organizace (WHO) se ročně nakazí přes 160 tisíc lidí. Jedná se zejména o přenos HIV a hepatitidy B a C. V České republice se dle vyhlášky 143/2008 Sb. povinně vyšetřují specifické sérologické markery infekce HIV, HBV, HCV a syfilis takto: anti-HIV1 + anti-HIV2, HIV Ag p24, HbsAg, anti-HCV, protilátky proti původci syfilis. Tato screeningová vyšetření jsou součástí kritérií pro propuštění transfuzních přípravků pro další práci s nimi (48, 49).

V oblasti diagnostiky se objevuje další problém, a to je infekční nebo také diagnostické okno. Jedná se o období, kdy už může být pacient několik týdnů až měsíců nakažen, ale tělo onemocnění nezaznamená. Tím se prodlouží i tvorba protilátek proti přítomnému viru a detekce je prokázána déle. Právě tím je infekční okno rizikové. Odebraná krev už může být ve stádiu nákazy infikována, ale sérologické testy přítomnost infekčního markeru neprokáží. Pokud by však testy byly opakovány za několik týdnů, je velká pravděpodobnost, že v těle budou vytvořeny protilátky, které budou detekovatelné a bude tak možné stanovit reaktivitu daného infekčního onemocnění. V současné době však existují technologie citlivějšího testování krve, metoda nazývaná NAT. Tato metoda využívá detekce přímo nukleové kyseliny viru a je schopna detekovat onemocnění zhruba o měsíc dříve, tím se zkrátí rizikové období infekčního okna. Právě metoda NAT by mohla snížit přenos např. hepatitidy C až třikrát a celkově by se snížila pravděpodobnost přenosu infekce na zdravou populaci. V současnosti se vyšetřování nukleových kyselin provádí pouze na velmi malém množství pracovišť (jedno z nich právě ÚVN OHKT). Cílem odborné Společnosti pro krevní

transfuzi je prosadit povinné testování na nukleové kyseliny v České republice a zařadit toto testování do legislativy (48, 49, 50).

Molekulárně biologické metody, kterými se zjišťuje přítomnost nukleové kyseliny daného viru (Nucleic acid testing – NAT), je v současné době velmi přínosnou cestou, jak snížit infekčnost. Značná část zemí světa proto v posledních 15 letech zavedla k serologickým testům i rutinní vyšetření NAT. NAT vyšetření bylo poprvé zavedeno v Německu v roce 1997. Dnes je celosvětově metodami NAT testováno 66-70 % dárcovské populace. V Evropě jde o 61 % dárců, v Asii a Rusku 76 %, v Severní Americe 84 %, v Africe 13 % a v Austrálii a Oceánii 39 %. Jedná se o metodu, která je ve světě poměrně rozsáhlá a tvoří součást rutinních vyšetření

Počet a nárůst serologického a NAT vyšetření se na pracovišti OHKT ÚVN v Praze se každým rokem zvyšuje. Ve své práci jsem se zabývala přehledem statistiky za rok 2016 a 2017. V roce 2016 zde bylo sérologicky zpracováno měsíčně 17 692 vzorků, které byly vyšetřovány na HBsAg, a-HCV, HIV1+2, Ag p24 a syfilis. Z toho bylo pět dárců reaktivních na syfilis a jeden byl skutečně v NRL pro syfilis SZÚ v Praze potvrzen jako pozitivní (3 prvodárci, 2 dárci opakovaně darující). Do NRL pro hepatitidy SZÚ v Praze byly dále zaslány vzorky reaktivní na HBV (3 opakovaní dárci, HCV (4 prvodárci, 3 dárci opakovaní dárci). HIV jako nejrizikovější infekce nebyla prokázána u 9 falešně reaktivních vzorků dárců (2 prvodárci a 7 opakovaně darujících). PV B19 skutečně NRL pro zarděnky, spalničky, parotitidu a parvovirus potvrzen u 1 dárce (50, 51).

Co se týká převahy pohlaví u těchto onemocnění, tak v roce 2016 převažovali zejména ženy s výjimkou HIV, kde bylo 7 mužů reaktivních. Metodou NAT bylo vyšetřeno za rok 2016 17 571 dárců na HBV, HCV, HIV, HAV a PVB19. Jedná se o počty vyšetření z center ÚVN. Jak jsem zmiňovala, v laboratoři jsou vyšetřovány i vzorky z některých plazmacenter z České republiky. Počet serologických vyšetření z externích vzorků byl za rok 2016 1 184 152, NAT metodou 992 955 (51).

Za rok 2017 se počty vyšetření zvýšily a reaktivity pacientů lehce ubyly. U syfilisu byli 4 dárce reaktivní a z toho jeden pozitivně potvrzený. Z těchto hodnot byl 1 prvodárce. Za tento rok byl u HBsAg pouze jeden nový reaktivní dárce. U a-HCV byl počet reaktivních vyšší než v předchozím roce a to 12, z toho 6 prvodárců, u HIV stanoveno 9 falešně pozitivních vzorků (2 prvodárci, 7 opakovaně darujících). PVB19 byl prokázán u 1 muže. U těchto reaktivit převažuje mužské pohlaví. Za rok 2017 bylo serologickou metodou vyšetřeno 18 302 vzorků a metodou NAT 18 294. Počet externích vzorků vyšetřených sérologicky byl 1 584 940 a metodou NAT 1 175 460_(51).

Rozšířené testování molekulárně biologickými metodami je v každém případě na místě. Promořenost české populace představuje pro obyvatele epidemiologický a transfuziologický problém (HEV, PVB19 a další). Co se týká rozsahu infekčnosti mezi populací, tak se udává například u hepatitidy C 10 případů na 100 tisíc obyvatel. Od roku 1988 do konce roku 2015 bylo v České republice detekováno zhruba 54 HIV pozitivních dárců krve s vysokým relativním počtem HIV pozitivních osob mezi prvodárci_(51).

Odhadované riziko přenosu infekce krevní transfuzí je v ČR u virových hepatitid 1:300 000, u HIV 1:2 000 000 podaných transfuzí. Toho je důkazem incident, který se stal v roce 2005, kdy byl nakažen mladý muž HIV nechráněným intimním stykem s jiným mužem, HIV pozitivním. Sérologickými testy nebylo možné HIV detekovat, neboť dárce daroval krev brzy po infekci v období diagnostického okna. Technologie NAT by přítomnost HIV v jeho krvi prokázala a nedošlo by tak k výdeji HIV pozitivního transfuzního přípravku. Tento případ je už 13 let starý a stále nedošlo ke změně v legislativě, aby se NAT mohlo provádět na více místech České republiky a přispět tak ke snížení rizika přenosu infekčního onemocnění_(48).

7 ZÁVĚR

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala problematikou infekčních onemocnění. Zabývala jsem se dárčovstvím krve a jejím vyšetřením na oddělení hematologie a krevní transfúze v ÚVN v Praze. Toto pracoviště jsem si vybrala z důvodu jeho zaměření na moderní technologie ve vyšetřování infekčních markerů, které je na takové úrovni, že by mohla být do budoucna prokazatelným důkazem, proč rozšířit serologická vyšetření o molekulárně biologickou metodu NAT po celé České republice.

Světová statistická data i data z ÚVN, která jsou zde uvedena, potvrzují, že s příchodem NAT se počet nakažených pacientů může snížit díky včasnému odhalení infekce u dárce krve. Bohužel, stále se nepodařilo úplně vyloučit přenos infekčního onemocnění transfúzním přípravkem, ale jestliže se nabízejí nové a moderní technologie, které toto riziko mohou snížit, měly by být využity.

Na OHKT dnes využívají pro serologické vyšetření imunochemický analyzátor cobas® 8000 od společnosti Roche skládající se ze 6 modulů, které zvládají každodenní nápor vzorků s přehledem. Pro NAT vyšetření využívají systém cobas® s201, Hamilton® MICROLAB STAR/STARlet IVD, cobas® AmpliPrep a cobas® TaqMan. Všechny tyto části vytvářejí prostředí pro práci na úrovni molekulárně biologické, kdy využívají přímo DNA či RNA viru, a proto jsou schopny zkrátit diagnostické a okno a odhalit tak mnohem dříve případné infekční onemocnění.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- AIDS – Syndrom získané imunodeficiencie
- Anti – HBc – Protilátka proti dřeňovému antigenu viru hepatitidy B
- Anti – HBe – Protilátka proti e-antigenu viru hepatitidy B
- Anti – HBs – Protilátka proti povrchovému antigenu viru hepatitidy B
- Anti – HCV – Protilátky proti viru hepatitis C
- B19 NAT – Nucleid acid test – B19 lidský parvovirus
- ČČK – Český červený kříž
- ČSL JEP – Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně
- DNA – Deoxyribonukleová kyselina
- EDTA – Kyselina ethylendiamintetraoctová
- ELISA – Enzymové imunoanalýzy na pevné fázi
- HAV – Virus hepatitidy A
- HBV – Virus hepatitidy B
- HCV – Virus hepatitida C
- HIV – Virus lidské imunitní nedostatečnosti
- HBeAg – e-antigen viru hepatitidy B
- HBsAg – Povrchový antigen hepatitidy B
- HBV NAT – Nucleic acid test – hepatitidy B
- IgM – Imunoglobulin M
- NAT – Nepřímý antiglobulinový test
- NRL – Národní referenční laboratoř
- OHKT – Oddělení hematologie a krevní transfuze
- PCR – Polymerázová řetězová reakce
- PV B19 – Parvovirus B19
- RNA – Ribonukleová kyselina
- RIBA – Rekombinantní imunoblotovací analýza
- ÚVN – Ústřední vojenská nemocnice

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. http://cervenykriz.eu/cz/bdk_dokumenty.aspx.

http://cervenykriz.eu/cz/bdk_dokumenty.aspx. [Online] dokument.

2. *Historie zdravotnictví*. 2017. Praha : Martin Koláček - E-knihy jedou, 2017.

3. Penka, Miroslav a Slavičková, Eva. *Hematologie a transfuzní lékařství*. 1. vyd. Praha : Grada, 2012.

4. Srov. Legislativa Dárcovství krve, [online], Dostupné z

[www:http://www.transfuznispolecnost.cz/legislativa_darcovstvi.php](http://www.transfuznispolecnost.cz/legislativa_darcovstvi.php).

[www:http://www.transfuznispolecnost.cz/legislativa_darcovstvi.php](http://www.transfuznispolecnost.cz/legislativa_darcovstvi.php). [Online] 1994.

[www:http://www.transfuznispolecnost.cz/legislativa_darcovstvi.php](http://www.transfuznispolecnost.cz/legislativa_darcovstvi.php)..

5. Řeháček, Vít a Masopust, Jiří. *Transfuzní lékařství*. 1. vyd. Praha : Grada, 2013.

6. Dop_STL2007_03 Způsobilost k dárcovství_V7. *Dop_STL2007_03 Způsobilost k dárcovství_V7* [online]. Praha: Společnost pro transfuzní lékařství ČLS JEP, 2014 [cit. 2017-10-25]. Dostupné z:

http://www.transfuznispolecnost.cz/index.php?page=dokumenty&identifikator_kategorie=DOPORUCENE_POSTUPY

7. PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství*. 1. vyd. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3460-6.

8. ROZSYPAL, Hanuš. *Základy infekčního lékařství*. Vydání první. V Praze: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2015. ISBN 978-80-246-2932-2

9. EHRMANN, Jiří a Petr HŮLEK. *Hepatologie*. 2. vyd. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-5510-6.
10. BOHONĚK PH.D., prim. a Ing.Ludmila LANDOVÁ PH.D. Vyšetření dárců krve na krví přenosné infekce metodami NAT. *Zpravodaj vojenského zdravotnictví*. 2014, 15(122014), 8-15.
- 11.SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-3170-4. (str.145, 156, 157)
- 12.ŽloutenkatypuA,B, C. <https://www.ockovacentrum.cz/cz/zloutenka-typu-ab> [online]. Brno: Avenier a.s., 2007 [cit. 2017-10-30]. Dostupné z: <https://www.ockovacentrum.cz/cz/zloutenka-typu-ab>
13. HAMPLOVÁ, Lidmila. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena pro bakalářské studium a všechny typy zdravotnických škol*. V Praze: Stanislav Juhaňák - Triton, 2015. ISBN 978-80-7387-934-1.
14. Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi. [Http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/A/JMAAA.htm](http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/A/JMAAA.htm) [online]. Praha: Projekt SEKK, 2014 [cit. 2017-11-09]. Dostupné z: <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/A/JMAAA.htm>
15. WHITESIDE, Alan. *HIV and AIDS: a very short introduction*. Second edition. New York, NY: Oxford University Press, 2016. Very short introductions. ISBN 978-0-19-872749-1.
16. BOHONĚK, PH.D, pplk. MUDr. Miloš. *Organizace transfuzní služby*. ÚVN

Praha, 2016.

17. Pohlavní nemoci - Syfilis. *Http://www.pohlavni-nemoci-a-jejich-priznaky.cz/syfilis-prijice-lues* [online]. Brno: Propeople, 2017 [cit. 2017-11-24]. Dostupné z: <http://www.pohlavni-nemoci-a-jejich-priznaky.cz/syfilis-prijice-lues>
18. Syfilis. *Http://www.venerologie.cz/prehled-onemocneni/#onemocneni-syfilis* [online]. Praha: Medicínské centrum Praha, 2017 [cit. 2017-11-24]. Dostupné z: <http://www.venerologie.cz/onemocneni/syfilis/>
19. *Laboratorní vyšetření - infekční a biochemické markery*. In: . Praha: Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP, 2009, ročník 2009, číslo 2.
20. *Směrnice pro kontrolu krve po odběru krve*. 17.12.2015. ÚVN Praha - Úsek centrálních laboratoří - OHKT: ÚVN Praha - Úsek centrálních laboratoří - OHKT, 2016.
21. Hepatitida B. *Https://www.ockovacentrum.cz/cz/zloutenka-typu-b* [online]. Brno: Avenier a.s, 2015 [cit. 2018-03-26]. Dostupné z: <https://www.ockovacentrum.cz/cz/zloutenka-typu-b>
22. Hepatitida B. *Http://www.venerologie.cz/onemocneni/hepatitida-b/* [online]. Praha: Medicínské centrum Praha, 2015 [cit. 2018-03-26]. Dostupné z: <http://www.venerologie.cz/onemocneni/hepatitida-b/>
23. Původci virových hepatitid. *Lf1.cz/wp-content/uploads/p--vodci-virov--ch-hepatitd.doc* [online]. Praha: 1. Lékařská fakulta v Praze, 2016 [cit. 2018-03-26]. Dostupné z: lf1.cz/wp-content/uploads/p--vodci-virov--ch-hepatitd.doc
24. Hepatitida C. *Http://www.venerologie.cz/onemocneni/hepatitida-c/* [online].

Praha: Medicínské centrum Praha, 2015 [cit. 2018-03-26]. Dostupné z: <http://www.venerologie.cz/onemocneni/hepatitida-c/>

25. HIV. <https://www.wikiskripta.eu/w/HIV> [online]. Praha: METANET, 2018 [cit. 2018-03-26]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/HIV>

26. Syfilis. <https://www.wikiskripta.eu/w/Syfilis> [online]. Praha: METANET, 2018 [cit. 2018-03-26]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Syfilis>

27. ParvovirusB19. <https://www.zuova.cz/Content/files/articles/plesnik/smd196f> [online]. Praha: SZÚ Praha, 2004 [cit. 2018-04-03]. Dostupné z: <https://www.zuova.cz/Content/files/articles/plesnik/smd196.pdf>

28. ANDERSON, Larry J. a Neal S. YOUNG. *Human parvovirus B19*. 1997. New York: Karger, c1997. ISBN 3-8055-6353-1.

29. *Vyšetření infekčních markerů u dárců krve na analyzátoru cobas 8000*. 2017. Praha: OHKT ÚVN Praha, 2017.

30. *Vyšetření NAT testem MPX u dárců krve na analyzátorech cobas s 201*. 2017. Praha: OHKT ÚVN Praha, 2017.

31. GÖPFERTO VÁ, Dana, Petr PAZDIORA a Jana DÁŇOVÁ. *Epidemiologie infekčních nemocí: učebnice pro lékařské fakulty (bakalářské a magisterské studium)*. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0452-3.

32. *HBsAg, Cobas* [online]. 1. USA: Roche Diagnostics, 2017 [cit. 2018-04-03]. Dostupné z: file:///F:/datasheets_2_2018/HBsAg.pdf

33. *Anti-HCV, Cobas* [online]. 5. USA: Roche Diagnostics, 2018 [cit. 2018-04-03].

Dostupné z: file:///F:/datasheets_2_2018/AHCV.pdf

34. *HIV combi PT, Cobas* [online]. 1. USA: Roche Diagnostics, 2017 [cit. 2018-04-03]. Dostupné z: file:///F:/datasheets_2_2018/HIVCPT.pdf

35. *Syphilis, Cobas* [online]. 1. USA: Roche Diagnostics, 2017 [cit. 2018-04-03]. Dostupné z: file:///F:/datasheets_2_2018/syphilis.pdf

36. *Vyšetření NAT testem DPX u dárců krve na analyzátoch cobas s 201*. 1. Praha: OHKT ÚVN Praha, 2017.

37. *Automatická detekce produktů PCR v reálném čase pomocí analyzátoru COBAS® TaqMan®* [online]. USA: Roche Diagnostics, 2015 [cit. 2018-04-03]. Dostupné z: file:///F:/datasheets_2_2018/dpx.pdf

38. Bezplatné a bez příspěvkové dárcovství krve. [Http://cervenykriz.eu/cz/proc_bdk/BDK.pdf](http://cervenykriz.eu/cz/proc_bdk/BDK.pdf) [online]. Praha: Český červený kříž, 2018 [cit. 2018-04-10]. Dostupné z: http://cervenykriz.eu/cz/proc_bdk/BDK.pdf

39. GALUSZKOVÁ, D. Světový den dárcovství krve. *Medicína pro praxi* [online]. 2008, 5(5), 187 [cit. 2018-04-10]. ISSN 1803-5310. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2008/05/01.pdf>

40. Hepatitida A. [Http://www.szu.cz/tema/prevence/hepatitida-a](http://www.szu.cz/tema/prevence/hepatitida-a) [online]. Praha: Státní zdravotní ústav, 2018 [cit. 2018-04-15]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/hepatitida-a>

41. Stavba viru hepatitidy A. In: [Https://basicmedicalkey.com/13-hepatitis-viruses/](https://basicmedicalkey.com/13-hepatitis-viruses/) [online]. North Chicago, Illino: Dr. J. H. Hoofnagle and of Abbot Laboratories, Diagnostic Division, 2017 [cit. 2018-04-21]. Dostupné z:

<https://basicmedicalkey.com/13-hepatitis-viruses/>

42. Stavba viru hepatitidy B. In: *Http://www.zzjzdnz.hr/hr/zdravlje/prevenција-zaraznih-bolesti/865* [online]. Dubrovnik: Mato Lakić, dr. med. spec. epidemiologije, 2018 [cit. 2018-04-21]. Dostupné z: <http://www.zzjzdnz.hr/hr/zdravlje/prevenција-zaraznih-bolesti/865>

43. Hepatitida B. *Https://www.wikiskripta.eu/w/Hepatitida_B* [online]. Praha: Wikiskripta, portál mikrobiologie, 2017 [cit. 2018-04-21]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Hepatitida_B

44. Stavba viru hepatitidy C. In: *Http://www.epidemic.org/thefacts/viruses/retroviruses/* [online]. USA: The C. Everett Koop Institute, 2018 [cit. 2018-04-21]. Dostupné z: <http://www.epidemic.org/thefacts/viruses/retroviruses/>

45. Stavba viru HIV. In: *Https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=38751738* [online]. Germany: Thomas Splettstoesser, 2014 [cit. 2018-04-21]. Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=38751738>

46. *Treponema pallidum* (syphilis). In: *Https://antiinfectivedrugs.com/wp-content/uploads/2012/03/treponema_pallidum.jpg* [online]. Pearson Education: Benjamin Cumming, 2006 [cit. 2018-04-21]. Dostupné z: https://antiinfectivedrugs.com/wp-content/uploads/2012/03/treponema_pallidum.jpg

47. Parvovirus B19. In: *Https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/B19+virus* [online]. Saunders: Copstead, 1995 [cit. 2018-04-21]. Dostupné z:

<https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/B19+virus>

48. Bude v ČR zaveden povinný screening dárců krve metodami NAT?.

Https://www.tribune.cz/clanek/39023-bude-v-cr-zaveden-povinnny-screening-darcu-krve-https:/ [online]. Praha: Medical Tribune, 2016 [cit. 2018-04-21]. Dostupné z: [https://www.tribune.cz/clanek/39023-bude-v-cr-zaveden-povinnny-screening-darcu-krve-https:/](https://www.tribune.cz/clanek/39023-bude-v-cr-zaveden-povinnny-screening-darcu-krve-https/)

49. Plošné zavedení citlivějšího testování krevních transfuzí.

Https://www.irozhlas.cz/zivotni-styl/zdravi/krevni-transfuze-adam-vojtech-ministerstvo-zdravotnictvi_1803100947_pj [online]. Praha: Český rozhlas, 2018 [cit. 2018-04-21]. Dostupné z: https://www.irozhlas.cz/zivotni-styl/zdravi/krevni-transfuze-adam-vojtech-ministerstvo-zdravotnictvi_1803100947_pj

50. K problematice screeningu dárců krve na krví přenosné infekce v ČR a použití metod NAT. *Labor Aktuell* [online]. 2017, 1(61), 49 [cit. 2018-04-24].

Dostupné z: <http://www.roche-diagnostics.cz/home/casopis/LaborAktuell01171.html>

51. *Postup při interpretaci výsledků známek infekce při vyšetření dárců krve serologickými testy.* In: . Praha: OHKT ÚVN Praha, 2016, ročník 35, SM/10/v15.

52. *Postup při interpretaci výsledků PCR (NAT) testy: PCR RNA-HIV, PCR RNA-HCV, PCR DNA-HBV, PCR RNA-HAV, PCR DNA- parvoviru B19.* In: . Praha: OHKT ÚVN Praha, 2016, ročník 35, SM/10/v15.

53. *Postup při interpretaci nálezů z referenční laboratoře.* In: . Praha: OHKT ÚVN Praha, 2016, ročník 35, SM/10/v15.

54. *NRL pro AIDS, NRL pro infekční hepatitidy, Národní referenční laboratoře pro zarděnky, spalničky, parotitidu a parvovirus B19.* In: . Praha: OHKT ÚVN Praha, 2016, ročník 35, SM/10/v15.

55. TUREK, P. Bezpečnost krevní transfuze v ČR z pohledu standardu bezpečnosti obvyklého v EU. *Transfuze a hematologie dnes : časopis Společnosti pro transfuzní lékařství a Hematologické společnosti.* 2011, 17(3), 27-29. ISSN 1213-5763

56. LANDOVÁ PH.D., Ing. Ludmila. *Interní materiály z OHKT ÚVN v Praze.* OHKT ÚVN Praha, 2018.

10 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tab. 1 - Minimální rozsah před odběrového vyšetření	19
Tab. 2 - Počet jednotlivých vyšetření dárců z ÚVN za rok 2016	63
Tab. 3 - Přehled dárců odebraných na různých pracovištích ČR vyšetřené na ÚVN (mimo pacienty ÚVN)	64
Tab. 4 - Počet jednotlivých vyšetření dárců z ÚVN za rok 2017	65
Tab. 5 - Počet pozitivních pacientů za rok 2016 z NRL	66
Tab. 6 - Počet pozitivních pacientů za rok 2017 z NRL	67
Tab. 7 - Statistika reaktivních pacientů na ÚVN za rok 2016	67
Tab. 8 - Statistika reaktivních pacientů na ÚVN za rok 2017	68
Tab. 9 - Počet NAT reactive only vzorků ze všech pracovišť	69

11 SEZNAM PŘÍLOH