

**UNIVERZITA KARLOVA**

---

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**Katedra biologických a lékařských věd**



**Možnost využití stanovení avidity protilátek proti  
HIV pro detekci časně infekce**

## **Bakalářská práce**

Autor bakalářské práce: Michaela Diničová

Vedoucí bakalářské práce: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

Konzultant bakalářské práce: RNDr. Vratislav Němeček, CSc.

---

**Hradec Králové 2020**

## **PROHLÁŠENÍ**

*„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením konzultanta. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“*

V Praze 9. 8. 2020

.....  
Michaela Diničová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Touto cestou bych chtěla poděkovat vedoucímu bakalářské práce, panu PharmDr. Ondřeji Jand'ourkovi, Ph.D., za odbornou pomoc při psaní práce. Dále bych chtěla velice poděkovat svému konzultantu, RNDr. Vratislavu Němečkovi, CSc., za jeho odborné vedení a RNDr. Marku Malému, CSc. za statistické zpracování výsledků. Děkuji také MUDr. Andree Pavlíkové za motivaci při psaní této práce.

# Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Studijní program: Zdravotnická bioanalytika

Vedoucí bakalářské práce: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

Název bakalářské práce: Možnost využití stanovení avidity protilátek proti HIV pro detekci časně infekce

Určení časně infekce HIV je v ČR založené na kombinaci výsledků laboratorního vyšetření, klinického vyšetření a informací z epidemiologického hlášení. Identifikace pacienta v akutní fázi onemocnění umožňuje cílené vyhledávání kontaktů v zájmu snížení dalšího šíření HIV, protože pacienti v časně fázi onemocnění jsou nejrizikovější z hlediska přenosu infekce.

Jedním z laboratorních markerů akutní fáze onemocnění je nízká avidita protilátek, která vyjadřuje pevnost vazby mezi antigenem a protilátkou. Stanovení avidity je založeno na skutečnosti, že u recentních infekcí je avidita nízká, protože se protilátky s antigenem nevážou dostatečně pevně a až s vyžíváním imunitní odpovědi avidita stoupá. Kvantitativně je vyjádřena indexem avidity, který určuje jaká část protilátek (%) zůstane navázaná v komplexu s antigenem po inkubaci s chaotropním činidlem, v našem případě s roztokem guanidinu.

Výpovědní hodnota indexu avidity není absolutní, ale je užitečná jako doplněk ostatních parametrů, které se aktuálně používají pro posouzení stádia HIV infekce.

**Klíčová slova:** HIV, avidita, protilátky, časná detekce, diagnostika

# **Abstract**

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department of Biological and Medical Sciences

Study program: Specialist on Laboratory Methods

Supervisor: PharmDr. Ondřej Jand'ourek, Ph.D.

Title of diploma thesis: The possibility of determination of HIV antibodies avidity for early infection detection

The determination of early HIV infection in the Czech Republic is based on a combination of results of laboratory examination, clinical examination, and information from an epidemiological report. The identification of patient in the acute phase of the disease allows to search for targeted contact to reduce further spread of HIV, as patients in the early phase of the disease are the riskiest for transmission of infection.

One of the laboratory markers of the acute phase of infection is low avidity of antibodies, which expresses the strength of bonds between antigen and antibody. The determination of avidity is based on fact that avidity in recent infections is low because antibodies do not bind tightly enough to antigen and avidity increases when the immune response matures. Quantitatively, it is expressed by the avidity index, which determines what part of the antibodies (%) will remain bound in complex with the antigen after incubation with chaotropic agent, in our case with guanidine solution.

The predictive value of the avidity index is not absolute, but it is useful in addition to other parameters currently used to assess the stage of HIV infection.

**Key words:** HIV, avidity, antibodies, early detection, diagnostics

# Obsah

1. Cíl práce .....	8
2. Úvod.....	9
3. Historie.....	10
4. Patogeneze HIV infekce.....	11
4.1. Struktura HIV .....	11
4.2. Replikační cyklus viru HIV .....	14
4.3. Stádia HIV infekce .....	15
5. Epidemiologie .....	17
5.1. Situace v ČR a v Evropě.....	17
5.2. Cesty přenosu .....	19
6. Prevence šíření HIV infekce .....	22
6.1. Antiretrovirová terapie .....	23
7. Laboratorní diagnostika HIV .....	25
7.1. Organizace testování HIV v ČR.....	25
7.2. Diagnostické metody .....	26
7.2.1. Přímý průkaz .....	26
7.2.1.1. Antigen p24 .....	26
7.2.1.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	27
7.2.2. Nepřímý průkaz.....	28
7.2.2.1. Metody enzymové imunoanalýzy (EIA) .....	28
7.2.2.2. Westerblot .....	29
7.2.2.3. Rychlé testy .....	30
8. Sérologické metody stanovení časně fáze HIV-1 infekce.....	32
9. Experimentální část.....	36
9.1. Metoda stanovení AI testem ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo.....	36
9.2. Charakteristika analytického souboru .....	37
9.3. Vyhodnocení indexu avidity jako ukazatele akutního stadia na podkladě vyšetření analytického souboru .....	38
9.4. Charakteristika testovacího souboru .....	40
9.5. Výsledky stanovení indexu avidity jako možného ukazatele akutního stadia infekce HIV .....	41
10. Diskuze.....	43

11. Závěr .....	45
12. Seznam zkratk .....	46
13. Seznam literatury .....	48
14. Seznam obrázků .....	54
15. Seznam tabulek .....	55

## **1. Cíl práce**

Cílem práce bylo zjistit, zda je možné využít stanovení avidity protilátek proti HIV jako vhodné metody pro odhalení časně fáze infekce. Byl zvolen přístup modifikující enzymatickou imunoanalytickou metodu, která se rutinně používá k diagnostice protilátek HIV, s použitím guanidinu jako disociačního činidla.



## 2. Úvod

V současnosti žije celosvětově asi 38 milionů lidí infikovaných virem HIV a předpokládá se, že od začátku globální epidemie jich už 35 milionů tomuto onemocnění podlehl. Jde o celosvětový zdravotní, ale i socioekonomický problém. Pandemie HIV/AIDS upozornila na nerovnost v dostupnosti zdravotní péče, ekonomické síle i při ochraně základních lidských práv v jednotlivých zemích.

Nejvíce postiženým místem je Subsaharská Afrika, kde žije celosvětová většina lidí nakažených virem HIV. Situace se díky globální snaze řešit problematiku HIV společným úsilím mezinárodních organizací, výrobců diagnostik a léčiv zlepšila. Výsledkem je snížení nárůstu trendu vývoje v počtu nových případů, úmrtí, transplacentárního přenosu infekce na děti a dalších ukazatelů.

V teoretické části práce je popisována taxonomie retrovirů, morfologické vlastnosti viru HIV, jeho replikační cyklus a způsob šíření HIV infekce v populaci. Dále jsou zde uvedena základní klinická kritéria pro stanovení diagnózy HIV/AIDS, popis jednotlivých stádií onemocnění, a především možnosti laboratorní diagnostiky HIV v ČR.

Praktická část je zaměřená na stanovení a vyhodnocení indexu avidity protilátek proti HIV jako možného ukazatele časné fáze infekce.

### 3. Historie

V roce 1981 popsal americký lékař Dr. Michael Gottlieb několik případů zápalu plic způsobeného *Pneumocystis jirovecii* (v té době ještě *P. carinii*), který byl diagnostikován u mladých homosexuálních mužů s horečkou, dramatickou ztrátou váhy a vážně poškozeným imunitním systémem [1].

Na odhalení virového původce se pracovalo hlavně na dvou renomovaných pracovištích v USA a ve Francii. V USA pod vedením profesora Roberta Gallo a ve Francii v týmu profesora Luca Montagniera.

V roce 1983 se virus téměř současně podařilo oběma týmům izolovat. Došlo ale k soupeření ohledně prvenství objevu i o název objeveného viru. USA ho pojmenovali jako lidský T-lymfotropní virus (HTLV III), protože jevil některé společné charakteristiky s lidskými onkogenními viry HTLV I a II, zatímco francouzský tým ho pojmenoval jako virus lymfadenopatie (LAV).

V roce 1988 ho Mezinárodní komise pro taxonomii virů pojmenovala jako virus lidské imunitní nedostatečnosti (HIV). Prvenství ve sporu o objev viru HIV bylo v roce 1994 přiřčeno francouzskému týmu vedenému Lucem Montagnierem, který byl v roce 2008 spolu se spolupracovnicí Francoise Barré-Sinoussi oceněn Nobelovou cenou za medicínu a fyziologii. Luc Montagnier navíc v roce 1986 objevil v Západní Africe druhý typ tohoto viru – HIV-2.

Řada druhů opic je infikována příbuznými viry opičí imunodeficiencie (SIV), které pravděpodobně nevyvolávají u svého hostitele onemocnění a imunodeficienci. HIV se do lidské populace přenesl z opic, HIV-1 ze šimpanzů a HIV-2 z mangabejů.

K přenosu viru do lidské populace došlo zřejmě již počátkem 20. století. Nejstarší zdokumentovaný případ HIV-1 byl u lovce z Kinshasy z roku 1959 [2].

Zásadním milníkem v boji s infekcí HIV bylo objevení účinných léků, které zabraňují množení viru. Prvním účinným lékem byl azidothymidin (AZT), který byl používán od r. 1987. Dalším významným krokem bylo použití kombinované terapie, tzv. vysoko účinné antiretrovirové terapie (HAART), používané od r. 1996. Přestože infekci HIV lze velmi účinně zpomalit, dosud nebyl nalezen prostředek k jejímu vyléčení [3].

## 4. Patogeneze HIV infekce

Virus HIV napadá buňky imunitního systému, především T-lymfocyty. T-lymfocyty jsou buňky bílé krevní řady, vyvíjející se v thymu, kde probíhá jejich diferenciaci a funkční vyzrání. Následkem selekce (eliminace autoreaktivních klonů) se do krve se dostává pouze cca 5 %, které se usídí v sekundárních lymfatických orgánech.

T-lymfocyty jsou zodpovědné za specifickou buněčnou imunitu. Podle funkce je můžeme rozdělit na pomocné CD4+ a cytotoxické CD8+ T-lymfocyty.

Pomocné T-lymfocyty tvoří asi 55 % populace T-lymfocytů. Jejich úkolem je pomáhat ostatním buňkám imunitního systému při zneškodňování patogenů. Cytotoxické T-buňky usmrcují infikované nebo nádorově transformované buňky.

Po nakažení virem HIV nastává akutní fáze infekce, kdy dochází k intenzivnímu množení viru v CD4+ lymfocytech. Po několika týdnech hladina viru v krvi poklesne a dojde k opětovnému zvýšení počtu T<sub>H</sub> lymfocytů.

Infekce přechází do bezpříznakové fáze, která může trvat i 10 let, během níž je na jedné straně infikován a zničen velký počet CD4+ T-lymfocytů, ale na druhé straně jsou tyto ztráty kompenzovány produkcí nových buněk. Po určité době však dojde k vyčerpávání schopnosti organismu tyto ztráty T-lymfocytů nahrazovat, dojde k poklesu jejich množství, což se projevuje postupným snížením imunity.

Nemoc se dostane do poslední fáze tzv. syndromu získaného selhání imunity (AIDS), kdy postupně selhává imunitní systém a uplatňují se bakteriální, virové, parazitární a mykotické oportunní infekce, případně i nádorová onemocnění.

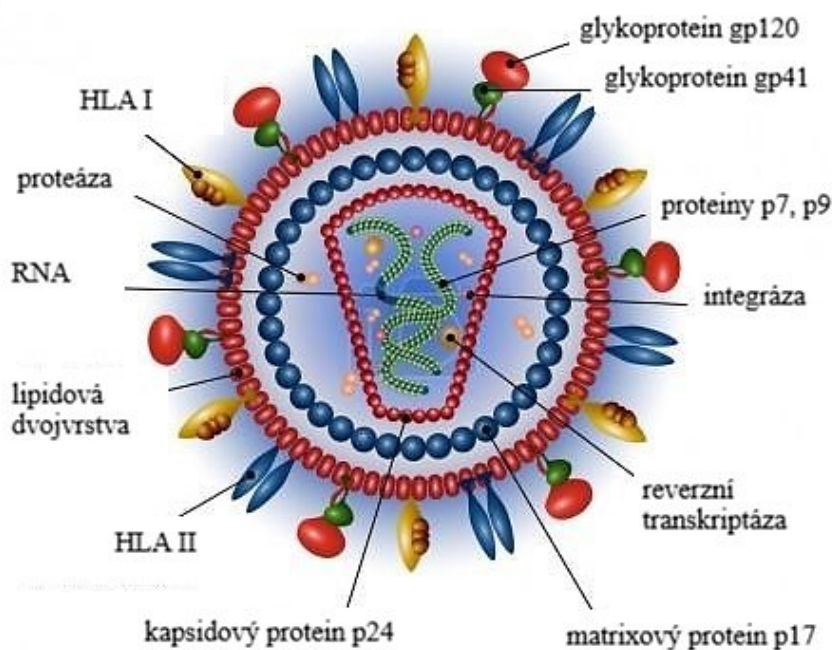
Množení viru a progresi onemocnění do terminálního stádia lze úspěšně ovlivnit antiretrovirovou terapií (ART). Laboratorním kritériem úspěšnosti léčby je snížení virové nálože v krvi, vyjádřené počtem kopií HIV-1 RNA/ml, na nedetekovatelnou nebo velmi nízkou hodnotu [4].

### 4.1. Struktura HIV

HIV je RNA virus z rodu *Lentivirus* (lat. *lentus* = pomalý – pomalu se rozvíjející infekce) z čeledi *Retroviridae*.

Patří do skupiny sexuálně přenosných nemocí a vyskytuje se ve dvou typech označovaných jako HIV-1 a HIV-2. HIV-1 je rozšířenější, způsobuje 95 % infekcí. Virus HIV-2, s mírnějším průběhem onemocnění, se vyskytuje především v zemích západní Afriky. Oba typy vedou v konečném stádiu k onemocnění AIDS.

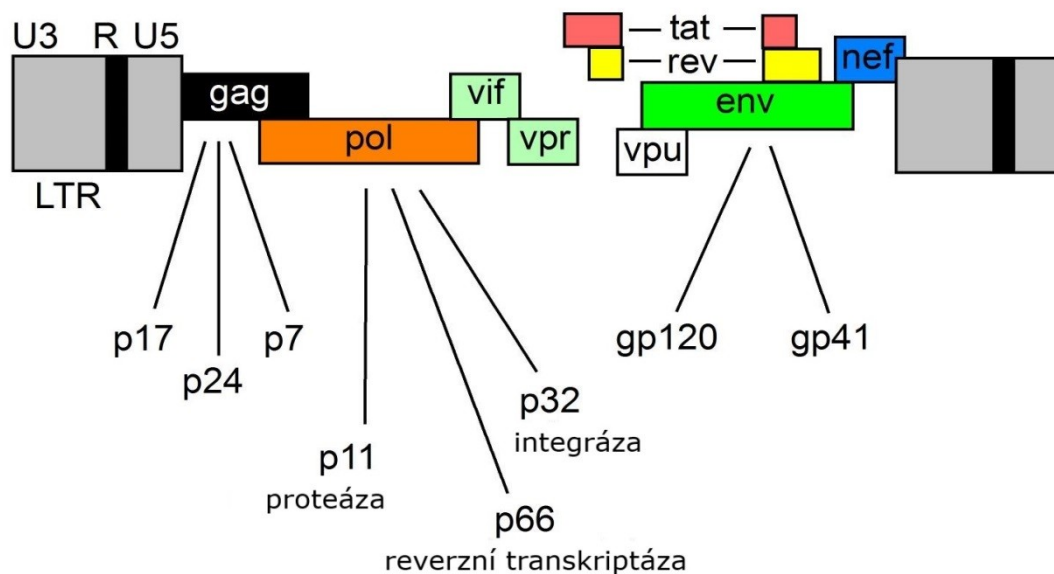
Virion má průměr 100 - 120 nm. Virový obal je tvořen fosfolipidovou membránou, do níž je zakotven transmembránový glykoprotein gp41, ke kterému je připojený povrchový glykoprotein gp120. Do obalu je z vnitřní strany zakotvená proteinová matrix, tvořená proteinem p17. Kapsida kónického tvaru, je tvořená proteinem p24. Nukleoid se skládá ze dvou identických jednořetězcových vláken RNA, dále obsahuje proteiny p7, p9 a enzymy (viz obr. 1) [5].



**Obrázek 1** - Struktura virionu HIV (zdroj: upraveno podle [https://fotky-foto.sk/fotobanka/hiv-virus-castice-struktura\(4-40666623\)/](https://fotky-foto.sk/fotobanka/hiv-virus-castice-struktura(4-40666623)/))

V genomu HIV bylo prokázáno 9 genů, z nichž tři jsou strukturní (*gag*, *pol* a *env*) a šest nestrukturních, které mají regulační funkci (*tat*, *rev*, *nef*). Organizace genomu HIV je znázorněna na obr. 2. Podle variability genů *gag* a *env* se rozlišuje nejméně 9 subtypů (A-I a O).

Přehled funkcí jednotlivých genů HIV je uveden v tabulce 1 a 2.



**Obrázek 2** - Organizace genomu HIV (zdroj: upraveno podle HIV 2011: Pathogenesis of HIV-1 Infection, <https://www.hivbook.com/category/part-1-the-basics/3-pathogenesis-of-hiv-1-infection>)

**Tabulka 1** - Strukturální geny HIV [6]

Gen a genový produkt	Popis funkce
<b>env (envelope)</b>	
gp 160	prekurzor env glykoproteinů
gp 120	vnější env glykoprotein
gp 41	transmembránový glykoprotein
<b>gag (core)</b>	
p 55	prekurzor gag proteinů
p 24	kapsidový protein (CA)
p 17	matrixový protein (MA)
p 15, p 9, p 7	protein vážící se na nukleovou kyselinu (NA)
<b>pol (polymerase)</b>	
p 66/51	reverzní transkriptáza (RT)
p 31	endonukleáza/integráza
p 11	proteáza

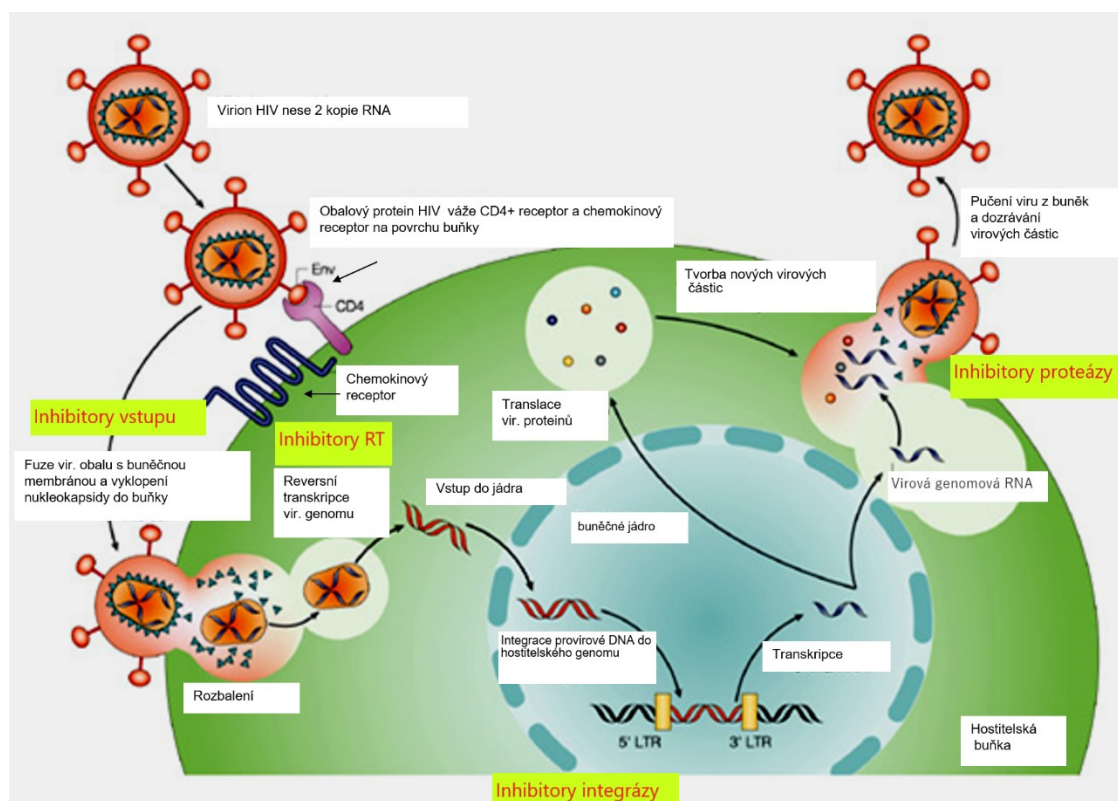
**Tabulka 2 - Regulační geny HIV [6]**

<b>Gen a genový produkt</b>	<b>Popis a funkce</b>
<i>tat</i> (transactivator) p 14	transaktivátor virových proteinů
<i>rev</i> (regulator of expression of virion proteins) p 19/20	reguluje expresi virových proteinů
<i>vif</i> (virion infectivity factor) p 23	určuje virovou infektivitu
<i>vpr</i>	neznámá funkce
<i>nef</i> (negative factor) p 27	redukuje virovou expresi
<i>vpu</i> (jen u HIV-1)	morfologie a maturace
<i>vpx</i> (jen u HIV-2)	neznámá funkce (snížení patogenity?)

## 4.2. Replikační cyklus viru HIV

Životní cyklus viru začíná navázáním obalových proteinů (gp120) na CD4 receptor, nacházející se na povrchu hostitelské buňky. CD4 znak se vyskytuje převážně na lymfocytech, v menší míře na makrofázích a monocytech. K vazbě jsou nutné koreceptory (chemokinové receptory CXCR4 a CCR5) na povrchu cílových buněk. Vytvořením této vazby dojde ke konformační změně, po níž dochází k fúzi virové a buněčné membrány, čímž se umožní průnik kapsidy s virovou RNA do hostitelské buňky. Po vstupu do buňky dochází k uvolnění virového genomu a následné reverzní transkripci virové RNA za vytvoření dvouřetězcové DNA enzymem reverzní transkriptáza. Vzniklá DNA je vložena enzymem integrázou do DNA hostitelské buňky. Takto zabudovaná virová DNA je označována jako provirová DNA. Provirus může být aktivní ihned nebo zůstat v nečinnosti i po dobu několika let. V případě aktivace je virová DNA transkribována do molekul RNA, které slouží k syntéze virových proteinů a nové virové RNA. Následně se vytváří nové virové částice, které se pučením uvolňují z buňky. Nově vzniklý virus dozrává a dosahuje plné infekčnosti (maturace) [7].

V současnosti existuje velmi úspěšná terapie infekce HIV, která je zaměřená na inhibici některých kroků životního cyklu viru, jde zejména o zabránění vstupu viru do buňky, inhibici reverzní transkriptázy, integraci do buněčného genomu nebo inhibici proteáz, které se podílejí na vytváření infekční virové částice (viz obr. 3). Přesto je dosud HIV infekce nevyléčitelná, protože není způsob, jak postihnout klidové CD4+ lymfocyty s integrovanou virovou DNA [3].



**Obrázek 3** - Replikační cyklus viru HIV a možnosti farmakologické intervence (zdroj: upraveno podle Nature reviews) [7]

### 4.3. Stádia HIV infekce

Dospělé infikované osoby lze podle klasifikace Centra pro kontrolu nemocí v Atlantě (CDC) zařadit do tří klinických kategorií označovaných písmeny A, B, C a k nim přiřadit laboratorní kategorii 1, 2 nebo 3 v závislosti na počtu CD4+ lymfocytů. Vzniká tak devět možných kombinací (A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2, C3), které odráží klinický stav pacienta.

**Stadium A. Akutní primární infekce (primoinfekce).** V průběhu 2-6 týdnů po infikaci virem se u postižených objeví první příznaky infekce. Primoinfekce často probíhá pod obrazem chřipkového onemocnění. Mezi časté příznaky patří zduření lymfatických uzlin, horečka nad 38 °C, průjem, noční pocení, zánět hltanu, bolesti

hlavy. Tyto symptomy zpravidla spontánně odezní do 1-3 týdnů. Přibližně do 2 týdnů se v krvi objeví p24 antigen a následně dochází k tvorbě protilátek proti HIV. Asi u 30-50 % nakažených, infekce probíhá bez klinických příznaků [8].

Po odeznění akutní infekce začíná asymptomatická fáze onemocnění, trvající u neléčených osob obvykle 2-8 let.

**Stadium B. Symptomatické stádium infekce** zahrnuje některé nespecifické příznaky trvající déle než měsíc. Jedná se o tzv. malé oportunní infekce a další stavy, kam řadíme např. orofaryngeální kandidózu, kandidovou vulvovaginitidu, orální leukoplakii, herpes zoster, horečku nebo průjem trvající déle než měsíc, cervikální dysplazii nebo karcinom *in situ*.

**Stadium C. Klinicky rozvinuté stádium nemoci – AIDS.** Poslední stádium nemoci se u neléčených pacientů objevuje po zhruba 10 letech. V tomto stadiu nemoci je již imunitní systém nemocného rozvrácen. Z toho důvodu se vyskytují různé oportunní infekce a nádorová onemocnění.

Mezi nejčastěji se vyskytující onemocnění patří pneumocystová pneumonie, encefalitida vyvolaná mikroorganismem *Toxoplasma gondii*, generalizovaná infekce virem *Herpes simplex*, cytomegalovirová retinitida, tuberkulóza (i mimoplicní), chronická kryptosporidióza, HIV encefalopatie nebo wasting syndrom. Nejčastějším nádorovým onemocněním ve stadiu AIDS je Kaposiho sarkom [9].

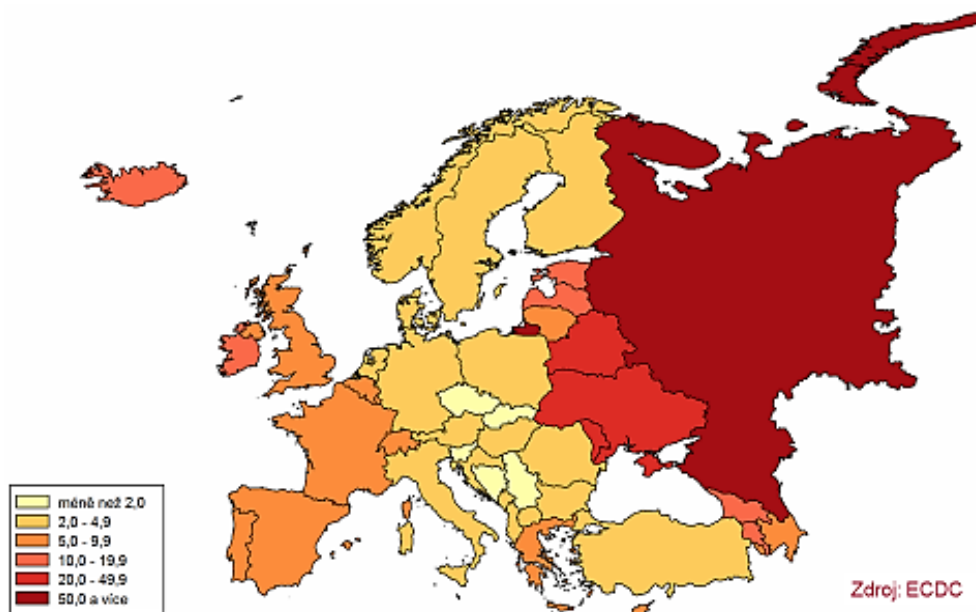
Další klasifikační schéma, založené výhradně na klinických aspektech onemocnění, vypracovala Světová zdravotnická organizace, v České republice se však nepoužívá [10].



## 5. Epidemiologie

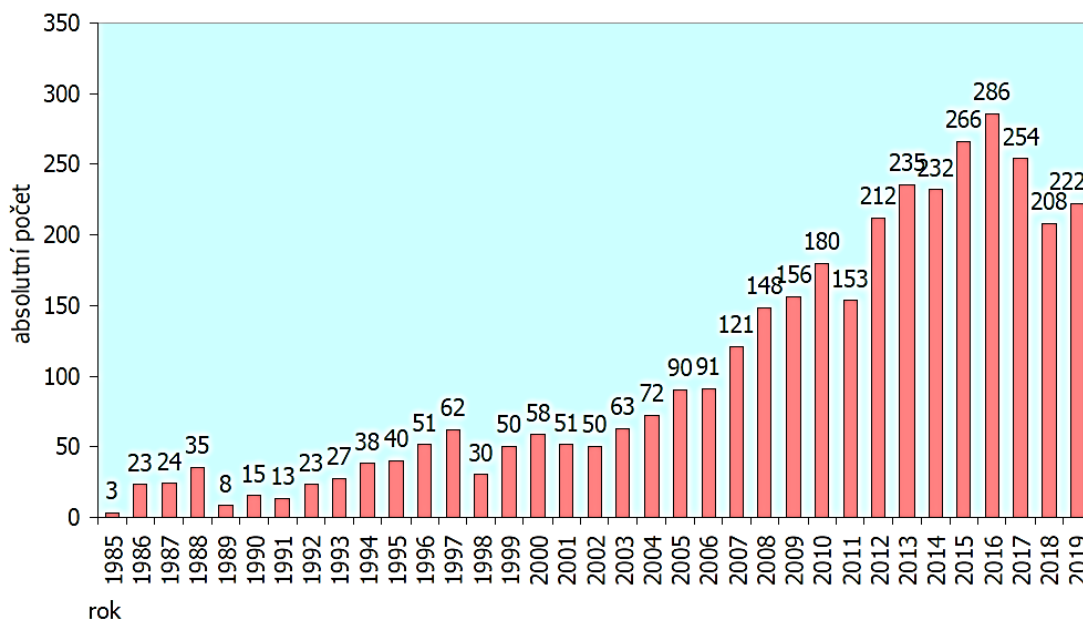
### 5.1. Situace v ČR a v Evropě

V Evropě je výskyt nových případů HIV infekce rozdílný (viz obr. 4). Státy západní Evropy mají ročně 5-10 případů na 100 000 obyvatel. Mnohem horší situace je ve východoevropských zemích, kde je výskyt nových případů vyšší než 20 na 100 000 obyvatel (Bělorusko, Ukrajina, Moldávie, Rusko).



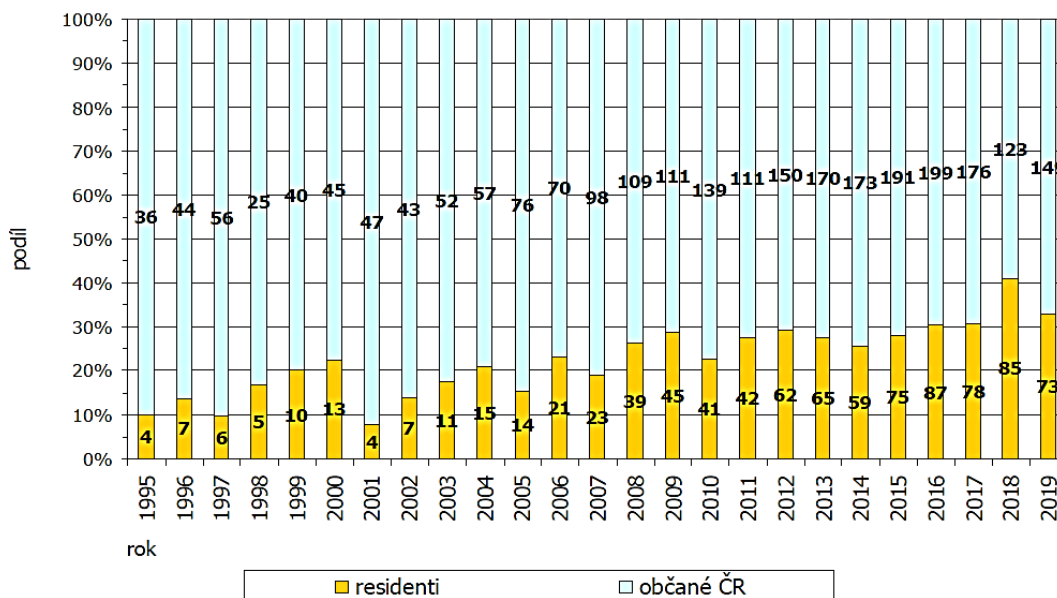
**Obrázek 4** - Nové případy infekce HIV v roce 2018 v Evropě, relativní údaje na 100 000 obyvatel (zdroj ECDC)

Česká republika patří k zemím, kde aktuálně evidujeme méně než 2 nové případy HIV na 100 000 obyvatel ročně. Celkový počet hlášených případů HIV v ČR od začátku sledování, tj. od roku 1985 do konce roku 2019, byl 3590 osob, z nichž 465 již zemřelo a 674 dospělo do stadia AIDS [11]. Až do roku 2002 byl výskyt nových případů HIV nízký. Od r. 2003 docházelo k soustavnému nárůstu počtu nových případů s vrcholem v roce 2016 s 286 případy. Nárůst se týkal pouze mužů, počet žen je setrvale na nízké úrovni mezi 20 až 25 případy ročně. Ve třech posledních letech (2017 – 2019) byl zaznamenán výrazně nižší počet nově diagnostikovaných osob (obr. 5).



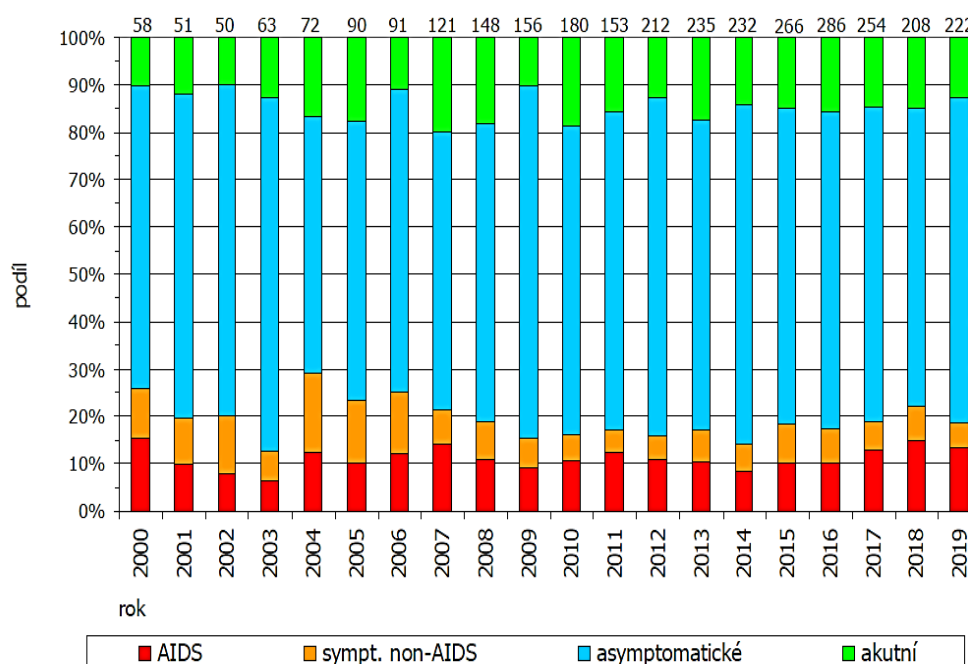
**Obrázek 6** - Počty nových případů infekce HIV v ČR v jednotlivých letech, absolutní údaje k 31. 12. 2019 (zdroj SZÚ)

Cizinci s trvalým pobytem (rezidenti) se v ČR významně podílejí na počtu nově potvrzených případů. Za posledních 12 let je to v průměru 29 % (obr. 6). Zemí původu je nejčastěji Slovensko, Ukrajina, Rusko a Polsko.



**Obrázek 5** - Nové případy HIV v ČR podle země původu, absolutní počty a relativní zastoupení v období 1. 1. 1995 – 31. 12. 2019 (zdroj SZÚ)

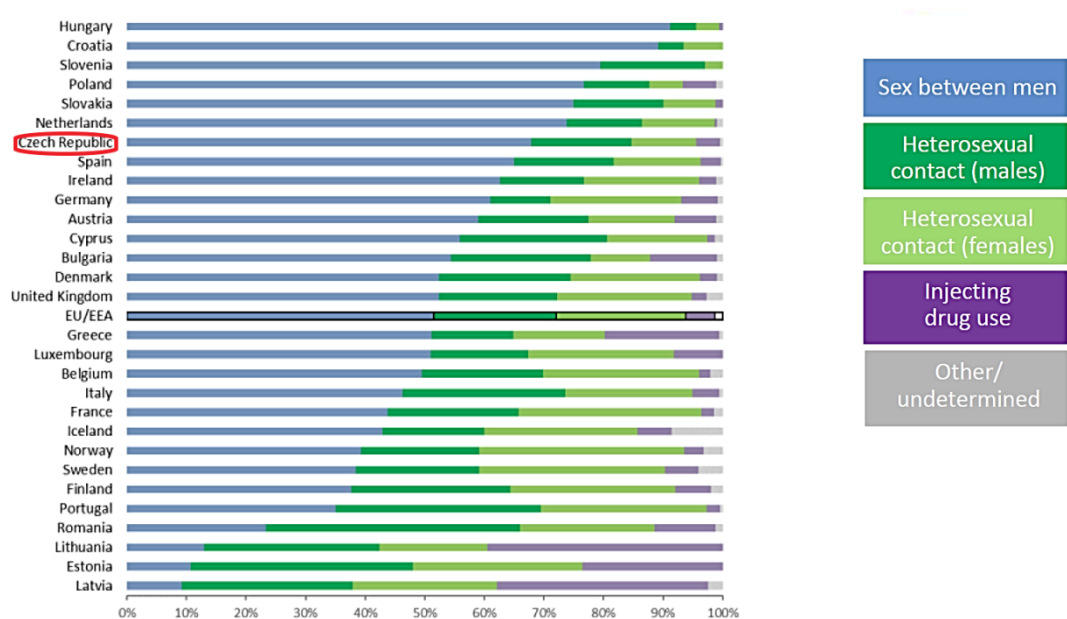
Podíl jednotlivých stádií (akutních, asymptomatických, symptomatických non-AIDS a klinických případů AIDS) v době záchytu v letech 2000 – 2019 ukazuje obr. 7. Počet akutních případů se dlouhodobě výrazně nemění a pohybuje se mezi 10 - 20 %. Závažný je podíl tzv. pozdních záchytů (symptomatický non-AIDS a AIDS), který se dlouhodobě pohybuje mezi 15 - 20 %. Za rok 2019 to v absolutních číslech znamená 28 pacientů ve stádiu akutní infekce, 53 v asymptomatickém, 11 v symptomatickém non-AIDS a 30 ve finálním stádiu onemocnění AIDS.



**Obrázek 7** - Nové případy HIV v ČR podle stádia v době záchytu, relativní zastoupení v období 1. 1. 2000 – 31. 12. 2019 (zdroj SZÚ)

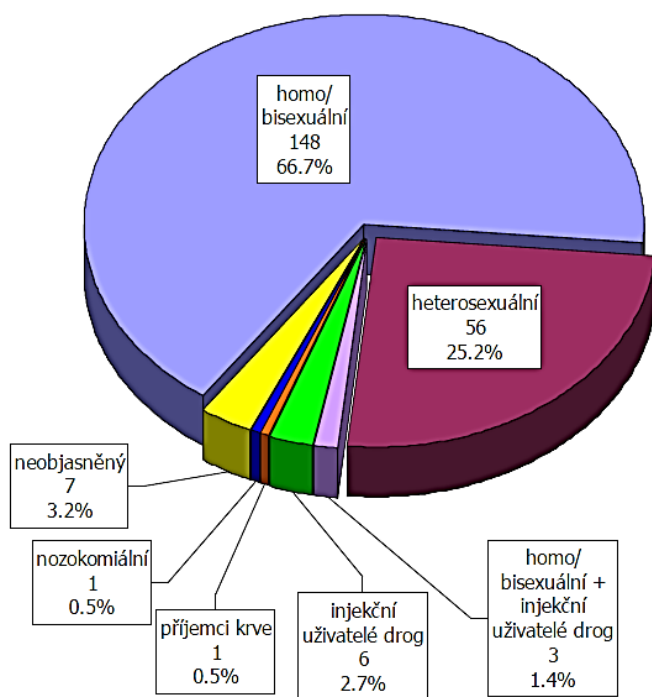
## 5.2. Cesty přenosu

Podíl jednotlivých způsobů přenosu se v zemích Evropské unie/ Evropského hospodářského prostoru (EU/EEA) výrazně liší (obr. 8). V České republice tvoří sexuální přenos, ať už homosexuální nebo heterosexuální, více než 90 % nově diagnostikovaných HIV pozitivních případů (obr. 8). Trvale dominuje homosexuální přenos u mužů majících sex s muži (MSM), který tvoří kumulativně od r. 1986 za celou dobu sledování 67 % z celkového počtu nově diagnostikovaných pacientů. Vstupní branou infekce je sliznice konečníku nebo pohlavního ústrojí. Nejvyšší riziko představuje receptivní anální styk.



**Obrázek 8** - Nově diagnostikované případy HIV v EU/EEA v r. 2018 podle zemí a způsobu přenosu v procentech (zdroj: ECDC/WHO, HIV/AIDS Surveillance in Europe 2018)

Heterosexuální přenos tvoří kumulativně 25 % případů. Nejméně se uplatňuje přenos prostřednictvím injekčního užívání drog s méně než 5 %. Data za rok 2019 jsou uvedena na obr. 9.

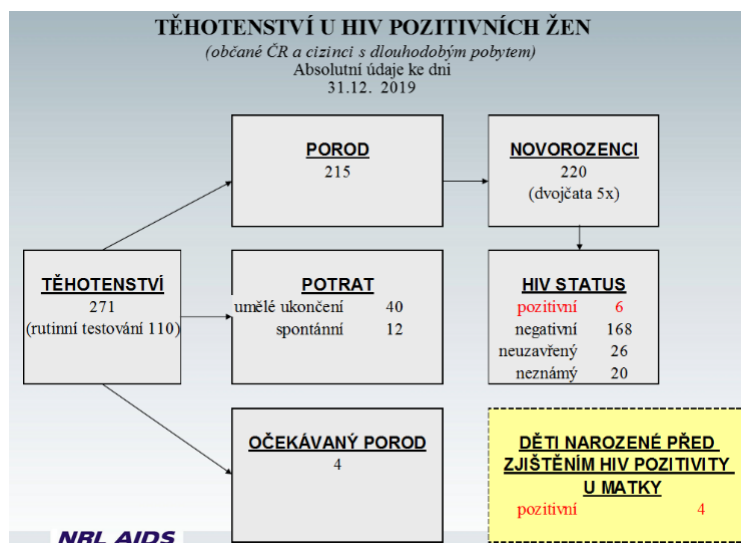


**Obrázek 9** - Rozdělení HIV pozitivních případů v ČR podle způsobu přenosu, údaje za rok 2019 (zdroj: SZÚ)

K parenterálnímu přenosu by mohlo dojít sdílením injekčních jehel, stříkaček a roztoků u intravenózních narkomanů, podáním infikované krve a krevních derivátů, nebo při krvavém poranění infikovanou jehlou či jiným předmětem, pokud nebyl zajištěn správný aseptický postup (nesterilní tetovací jehly, akupunktura, piercing).

Podíl přenosu viru HIV prostřednictvím injekčního užívání drog je v ČR setrvale nízký. Riziko přenosu sdílením injekčních jehel, roztoků a tzv. paraferálií je snižováno díky preventivním programům nabízejícím výměny použitých jehel v nízkoprahových kontaktních centrech. Riziko přenosu infekce HIV podáním kontaminované transfuze či krevních derivátů je v ČR díky důkladnému testování snížen na minimum. Vyšetření nukleové kyseliny (NAT) zatím v ČR povinné není, avšak čtyři transfuzní stanice již tímto způsobem provádějí screening dárců. Od roku 1988, kdy byl v ČR detekován první případ HIV pozitivního dárce krve, do konce roku 2019 bylo v souvislosti s dárcovstvím krve odhaleno 98 HIV pozitivních osob. [12]

Vertikální přenos infekce z matky dítě je z důvodů zavedení povinného screeningu těhotných žen ojedinělý. Od roku 1990 bylo odhaleno 110 gravidních HIV pozitivních žen (obr. 10), přičemž na celkovém počtu rodiček se významně podílí cizinky s dlouhodobým pobytem. Riziko vertikálního přenosu se snižuje podáváním antiretrovirové léčby HIV pozitivním matkám, plánovaným porodem vedeným císařským řezem a profylaktickým podáváním antiretrovirové terapie novorozencům prvních 4-6 týdnů života. K přenosu HIV může dojít i při kojení, proto se po porodu zastavuje laktace. Z celkového počtu dětí narozených v ČR byla diagnostikována HIV pozitivita u 6 dětí (obr. 10). Jednalo se zpravidla o nesledovanou graviditu bez řádné



**Obrázek 10** - Absolutní počty těhotenství u HIV pozitivních žen, kumulativní údaje k 31.12.2019 (zdroj SZÚ)

zajišťovací terapie.

## 6. Prevence šíření HIV infekce

Preventivní aktivity představují důležitý nástroj k snížení výskytu a šíření rizikového chování ve společnosti.

Lze ji rozdělit na primární, sekundární a terciární. Cílem primární prevence je předcházet vzniku rizikového chování u osob, u kterých ještě k rizikovému chování nedošlo, případně oddálit jeho vznik.

Sekundární prevence je zaměřená na předcházení vzniku, rozvoji a přetrvávání rizikového chování u osob, které jsou již rizikovým chováním ohrožené. Podstatou je včasná diagnostika a zabránění progresi vývoje nemoci.

Terciární prevence je zaměřená na pacienty v rozvinutém stádiu onemocnění, s cílem omezit progresi onemocnění. Patří sem léčba, udržení kvality života i snaha o jejich reintegraci.

Vzhledem k tomu, že dosud neexistuje vakcína proti viru HIV, snaží se jednotlivé epidemiologické přístupy bránit šíření viru HIV podle způsobu přenosu.

Prevence je realizovaná prostřednictvím informačních materiálů, poradenstvím, poučením o snižování rizika především používáním kondomů, výměnou použitých jehel a stříkaček a v neposlední řadě léčbou HIV pozitivních osob. Úspěšná léčba snižuje virovou nálož na minimum, takže HIV pozitivní osoba přestává být zdrojem infekce.

Nejvyšší riziko přenosu představuje homosexuální styk. Kromě obvyklých preventivních opatření se osobám s rizikovým chováním doporučuje i tzv. pre-expoziční (PrEP), eventuálně postexpoziční profylaxe (PEP).

PrEP je určen ke snižování rizika přenosu infekce na HIV negativní osoby, které mají sexuálního partnera s aktivní HIV infekcí, nebo, u kterého není dosaženo léčbou adekvátní virové suprese, příp. pro osoby s vysokým rizikem nákazy jako je pohlavní styk s HIV pozitivní osobou a nechráněný pohlavní styk s osobou, která má více sexuálních partnerů. Maximální ochrany před HIV je dosaženo po dvoutýdenním užívání. PrEP nechrání před ostatními pohlavně přenosnými nemocemi, proto je doporučováno jeho užívání spolu s používáním kondomu. Aby se dosáhlo co nejvyšší účinnosti, užívá se pravidelně po celou dobu trvání rizika.

Postexpoziční profylaxe (PEP) označuje využití antiretrovirotik po jednorázovém případu vysoce rizikového chování, aby se zabránilo množení viru HIV a jeho šíření v těle. Aby byla terapie antivirotiky účinná je nutné ji zahájit co nejdříve, a to nejlépe do jedné hodiny po expozici, ale nejpozději do 72 hodin po ní. Doporučuje se podání trojkombinace po dobu čtyř týdnů.

U intravenózních uživatelů drog je prevence zaměřená jak proti samotnému šíření jevu narkomanie, tak i k snižování rizika nákazy HIV, hepatitid a dalších infekčních nemocí.

V ČR je trvale kolem 100 nízkoprahových zařízení, která jsou zaměřená zejména na intravenózní uživatele drog. V roce 2018 bylo v rámci výměnných programů vydáno 6 932 269 jehel a stříkaček. [13]

Prevence má ve strategii boje proti šíření viru HIV zásadní roli, přestože efekt včasného zahájení léčby a preexpoziční a postexpoziční profylaxe velmi účinně brání šíření HIV.

## **6.1. Antiretrovirová terapie**

ART se zahajuje co nejdříve po potvrzení HIV pozitivitu pacienta, přičemž se využívá léčba pomocí kombinace účinných látek v jedné tabletě [14].

Klinické studie prokázaly, že léčba kombinací antiretrovirotik je daleko účinnější a úspěšnější než monoterapie [15].

Cílem léčby je dlouhodobá suprese replikace viru HIV, prodloužení bezpříznakového období, snížení výskytu oportunních infekcí a regenerace imunitních funkcí. Snížení morbiditu a mortality spojené s HIV významně přispívá k prodloužení a zlepšení kvality života. Studie HPTN 052 (Léčba jako prevence), publikovaná v roce 2011, prokázala, že pokud je HIV pozitivní osoba účinně léčena pomocí ART, je minimální předpoklad, že svého HIV-negativního partnera nakazí [16].

K nejčastějším nežádoucím účinkům terapie patří toxicita účinných látek nebo vznik virové rezistence.

Podle mechanismu účinku lze ART rozdělit do 6 skupin (viz tabulka 3).

**Tabulka 3 – Výchet jednotlivých skupin antivirotik a jejich zástupci**

<b>Léková skupina</b>	<b>Léčivo</b>
Nukleosidové/nukleotidové inhibitory reverzní transkriptázy (NRTI/NtRTI)	zidovudin, lamivudin (3TC), emtricitabin (FTC), abacavir (ABC), tenofovir disoproxil fumarát (TDF), tenofovir alafenamid fumarát (TAF)
Nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (NNRTI)	efavirenz, etravirin, rilpivirin, doravirin,
Inhibitory proteáz (PI)	atazanavir, fosamprenavir, darunavir (DRV), ritonavir (r)
Inhibitory fúze (FI)	enfuvirtid
Inhibitory integrázy (INSTI)	raltegravir (RAL), elvitegravir, dolutegravir (DTG)
Inhibitory vstupu (EI)	maraviroc

Základní kombinaci ART lze vyjádřit vzorcem: [1 NRTI + 1 NNRTI] nebo 2 NRTI + INSTI nebo PI/r. (viz tabulka 4)

**Tabulka 4 - Antiretrovirotika pro základní kombinaci [3]**

<b>NNRTI</b>	<b>NRTI</b>	<b>INSTI</b>	<b>PI/r</b>
TDF	ABC	DTG	DRV/r
TAF	FTC	EVG/cobicistat	DRV/cobicistat
	3TC	RAL	



## 7. Laboratorní diagnostika HIV

### 7.1. Organizace testování HIV v ČR

Dle zákona č. 258/2000 Sb., O ochraně veřejného zdraví (§ 71), lze provést vyšetření na přítomnost HIV jen se souhlasem fyzické osoby. Za určitých podmínek lze ale provést vyšetření i bez souhlasu fyzické osoby, nebo v případě dárcovství, se jedná o předpokládaný souhlas s povinným vyšetřením. U dárců krve, tkání, orgánů a spermatu se provádí povinné vyšetřování na virus lidského imunodeficitu při každém darování. U dárek mateřského mléka se provádí povinné vyšetřování na virus lidského imunodeficitu jednorázově, před započítím dárcovství.

Bez souhlasu fyzické osoby je možné provést test na virus lidského imunodeficitu:

- a) u těhotných žen,
- b) u fyzické osoby, která má poruchu vědomí a u níž vyšetření na virus lidského imunodeficitu je významné z hlediska diferenciální diagnostiky a léčení bez provedení tohoto vyšetření může vést k poškození jejího zdraví,
- c) u fyzické osoby, které bylo sděleno obvinění z trestného činu ohrožování pohlavní nemocí včetně nemoci vyvolané virem lidského imunodeficitu nebo z trestného činu, při kterém mohlo dojít k přenosu této nákazy na jiné fyzické osoby,
- d) u fyzické osoby, která je nuceně léčena pro pohlavní nemoc. [17]

Laboratorní vyšetření můžeme rozdělit do tří skupin:

- 1) *Základní vyšetření.* Patří sem povinné testování dárců a těhotných žen (viz výše), vyšetření indikovaná lékařem, kam patří např. předoperační vyšetření, vyšetření na vlastní žádost, kdy má zájemce o testování možnost zvolit si vyšetření pod jménem nebo anonymně. Jedná se o jedinou výjimku, kdy zákon povoluje anonymní testování. Důležitou součástí preventivních programů je testování osob v rizikových skupinách (oblast komerčního sexu, injekční uživatelé drog, vězni atd.).
- 2) *Konfirmační vyšetření.* Všechna vyšetřující pracoviště mají zákonnou povinnost posílat reaktivní vzorky ke konfirmaci do Národní referenční laboratoře

pro HIV/AIDS (NRL pro HIV/AIDS). Pouze výsledek ověřený dalšími testy dle algoritmu konfirmačního vyšetření je možné označit za pozitivní.

- 3) *Speciální vyšetření.* Do této skupiny patří vyšetření virové nálože, tj. stanovení množství viru v ml plazmy, zpravidla pomocí polymerázové řetězové reakce. Tento test umožňuje monitorovat průběh infekce a efektivitu léčby HIV. K dalším vyšetřením v této kategorii patří stanovení rezistence vůči antivirotikům, určení subtypu nebo zjištění tropismu HIV. Indikace speciálních vyšetření je vyhrazena pro specializovaná klinická pracoviště (HIV centra).

## **7.2. Diagnostické metody**

Laboratorní diagnostika HIV je založená na stanovení protilátek, p24 antigenu nebo virové nukleové kyseliny. Přibližně za týden od expozice je možné infekci HIV prokázat stanovením virové RNA v plazmě. Za další týden se zpravidla objevuje antigen p24. Protilátky jsou obvykle detekovatelné po třech týdnech, dynamika protilátkové odpovědi je však individuální, proto má negativní výsledek testu zpočátku nízkou negativní prediktivní hodnotu, která narůstá s časem. Dva měsíce od posledního rizika nákazy (nechráněný sexuální styk, profesionální expozice, injekční aplikace drog atd.) je pravděpodobnost správnosti negativního výsledku cca 95 %, po třech měsících dosáhne 100 %. Tři měsíce po infekci virem HIV jsou prokazatelné protilátky všemi používanými testy. Každý test má však určitou míru nespecifity (v řádu desetin procenta). Z tohoto důvodu je nutné každý vzorek s reaktivním výsledkem potvrdit dalším (konfirmačním) vyšetřením.

### **7.2.1. Přímý průkaz**

Metody jsou založeny na přímém průkazu viru nebo jeho části ve vzorku pacienta. Patří sem testy pro detekci p24 antigenu a virové nukleové kyseliny.

#### **7.2.1.1. Antigen p24**

Antigen p24 lze obvykle detekovat v séru dva týdny po nakažení pacienta virem HIV. Jeho přítomnost odráží intenzivní množení viru. Detekce antigenu p24 umožňuje časnou diagnózu v době před nebo během sérokonverze. Několik týdnů (cca 8-10 týdnů) po infekci již nelze antigen v krvi detekovat [18]. Jeho znovuobjevení je jednou

ze známek progresu infekce [19]. K průkazu antigenu p24 se nejčastěji používá enzymová imunoanalýza. Existuje metoda pro samostatný průkaz antigenu p24 nebo test kombinující průkaz antigenu a protilátek. Antigen p24 přítomný ve vzorku se váže s protilátkami navázanými na pevné fázi. Promytím se odstraní nenavázané složky. Na zachycený antigen se vážou protilátky proti p24 značené biotinem. Následuje promývací krok. Vytvořený komplex se označí streptavidinem konjugovaným s alkalickou fosfatázou. V konečném detekčním kroku se do reakční nádoby opakovaně aplikuje substrát (4-methylumbelliferylfosfát). Konjugovaný enzym katalyzuje hydrolýzu tohoto substrátu na fluorescenční produkt (4-methylumbelliferon), jehož fluorescence se měří při 450 nm. Intenzita fluorescence je přímo úměrná koncentraci p24 ve vzorku. Specifitu stanovení antigenu p24 lze ověřit konfirmačním testem, ve kterém se antigen ve vzorku před vyšetřením neutralizuje přídáním protilátkou.

Screeningové testy čtvrté generace využívají současné stanovení antigenu p24, protilátek anti HIV-1 a anti HIV - 2. Kombinovaný test zkracuje fázi tzv. diagnostického okna přibližně o týden.

#### **7.2.1.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

PCR je víceřadová enzymatická metoda, která umožňuje po předchozí reverzní transkripci, exponenciální amplifikaci specifického úseku DNA vymezeného dvojicí použitých primerů. PCR reakce probíhá v termocykléru, v němž postupně dochází díky cyklickým změnám teploty k denaturaci DNA, přisednutí primerů, a nakonec s využitím DNA polymerázy k syntéze nové DNA.

Průběh PCR:

1. Denaturace - zahřátím na teplotu 92 – 95 °C dochází k disociaci dvouvláknové DNA na jednotlivé řetězce (ssDNA).
2. Nasednutí primerů (annealing) – při zchlazení na teplotu v rozmezí 45-60 °C dojde ke specifickému navázání primerů (krátkých oligonukleotidů) na komplementární sekvenci DNA. Tato fáze je nejdůležitější, protože na správném navázání primerů závisí specifita a citlivost celé PCR.
3. Elongace – probíhá většinou při 72 °C, což je optimální teplota pro činnost DNA polymerázy. Během této fáze dochází od 3' - konce primerů k vlastní syntéze

nových řetězců DNA. Reakce je katalyzovaná termostabilním enzymem Taq DNA polymerázou.

### **7.2.2. Nepřímý průkaz**

Tyto metody umožňují detekci protilátek vytvořených jako odpověď organismu na přítomnost viru. Metody založené na nepřímém průkazu se používají u základního i konfirmačního vyšetření.

Moderní imunoanalytické metody dosahují zvýšení citlivosti značením jedné z reagujících složek. Značkou může být vhodný enzym (enzymová imunoanalýza), fluorescenční nebo chemiluminiscenční látka (fluorescenční nebo chemiluminiscenční imunoanalýza), popř. další.

#### **7.2.2.1. Metody enzymové imunoanalýzy (EIA)**

Enzymová imunoanalýza je citlivá imunochemická metoda, která využívá k detekci antigenu nebo protilátek pevné fáze usnadňující oddělení vázaných a volných značených složek reakce. Jako pevné fáze se užívají různé plastové materiály – zkumavky, jamky mikrotitračních destiček, magnetické částice, na které se adsorbuje antigen v případě stanovení protilátek (nebo protilátka v případě stanovení antigenu). K takto vzniklému imunosorbentu se přidá vyšetřovaný vzorek nebo kontroly. Pokud jsou ve vzorku přítomné protilátky, dojde k vazbě na imunosorbent. Nenavázaná část vzorku se promytím odstraní. Vzniklý imunokomplex se prokazuje různými způsoby, nejčastěji pomocí druhé protilátky proti lidským imunoglobulinům značené enzymem (konjugát). Po inkubaci je nenavázaný konjugát odstraněn promytím. Následuje přidání substrátu s chromogenem. Přítomný enzym katalyzuje přeměnu substrátu za vzniku barevného produktu. Enzymatická reakce se po stanoveném čase zastaví hydrolýzou enzymu přidáním kyseliny. Barevný výsledek reakce se odečítá spektrofotometricky, absorbance produktu je přímo úměrná množství protilátek. Test se vyhodnocuje dle návodu výrobce.

Alternativní uspořádání EIA testu jako je blokační nebo neutralizační se v komerčních EIA testech zpravidla nepoužívají.

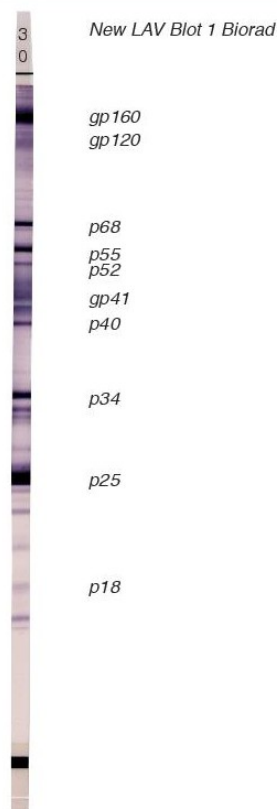


**Obrázek 11** - ELISA – odečet výsledků spektrofotometrem (zdroj SZÚ)

#### **7.2.2.2. Westernblot**

Virové proteiny jsou rozděleny v přítomnosti detergentů na polyakrylamidovém gelu v elektrickém poli podle jejich molekulové hmotnosti. V dalším kroku jsou rozdělené proteiny elektroforeticky přeneseny na nitrocelulózovou membránu. U komerčních testů tuto fázi provádí výrobce.

Vlastní vyšetření spočívá v inkubaci virových antigenů zachycených na nitrocelulózovém nosiči s vyšetřovaným vzorkem. Pokud jsou ve vzorku přítomny protilátky dojde k jejich navázání na odpovídající antigeny. Po vymytí nenavázaných složek následuje inkubace s konjugátem a po promytí je přidán substrát s chromogenem. Nerozpustný chromogen zůstává v místě reakce antigenu s protilátkou a vytváří na nitrocelulózovém nosiči barevný proužek (viz obr. 12). Po promytí a vysušení se provádí vyhodnocení výsledků podle návodu výrobce (dle doporučení CRSS - Consortium for Retrovirus Serology Standardization).



**Obrázek 12** - Snímek plně rozvinutého vzorce protilátkové odpovědi anti-HIV-1, test New LAV Blot (Biorad)

### 7.2.2.3. Rychlé testy

Jde o orientační testy poskytující výsledek zpravidla do 20 minut. Primárním materiálem je nejčastěji kapilární krev nebo sliny. Testy jsou založeny na principu imunochromatografického průkazu protilátek proti antigenům HIV-1 a HIV-2 na nitrocelulóзовé membráně. Vyhodnocení testu se provádí na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti barevných detekčních linií nebo teček. Odečet zahrnuje detekci specifické testovací linie prokazující na přítomnost HIV-1/HIV-2 protilátek i kontrolní linie, která slouží k ověření funkčnosti testu a kontrole správnosti jeho provedení (viz obrázek 13). Tyto testy jsou určeny pro použití proškoleným zdravotnickým personálem. Jen některé z nich lze využít i pro sebetestování, protože musí mít odpovídající CE certifikaci. Reaktivní výsledek rychlých testů rovněž podléhá zákonné povinnosti konfirmace v NRL pro HIV/AIDS.



Obrázek 13 - Anti-HIV reaktivní výsledek - rychlotesty od několika výrobců (zdroj SZÚ)

## 8. Sérologické metody stanovení časně fáze HIV-1 infekce

Identifikace pacientů v akutní fázi infekce HIV je v případě tohoto chronického a dlouhodobě latentně perzistujícího onemocnění důležitá z několika důvodů. Z epidemiologického hlediska umožňuje především kvalifikovaný odhad incidence onemocnění v populaci. Tato informace je klíčová pro zajištění cílených preventivních programů v rizikových skupinách a je také důležitým ukazatelem efektivity již zavedených opatření.

Na úrovni jednotlivých pacientů je v případě akutní nebo recentní infekce příležitost pro cílené trasování kontaktů v zájmu snížení možnosti dalšího šíření onemocnění. Analýzy dynamiky přenosu HIV v rámci subpopulačních studií potvrdily, že zdrojem infekce jsou především pacienti ve velmi časném stádiu, které je charakteristické vysokou virovou náloží [20]. Pokud by byli nově infikovaní jedinci včas identifikováni a okamžitě léčeni, výrazně by se snížil počet nových případů [21].

V současnosti se za „zlatý standard“ pro stanovení recentní infekce HIV považuje longitudinální sledování a opakované testování iniciálně negativní kohorty rizikových jedinců jakými jsou muži mající sex s muži, injekční uživatelé drog nebo sexuální pracovníci. Realizace tohoto přístupu je však časově i finančně náročná. Mnohem jednodušší a levnější je analýza založená na principu průřezové studie, v rámci které se mohou kombinovat výsledky několika metod. Sérologický testovací algoritmus pro nedávnou HIV sérokonverzi (STARHS – The Serological Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversion) je označení pro soubor laboratorních technik, které lze použít k odlišení akutní (méně než 6 měsíců trvající) a chronické infekce.

Během velmi rané fáze infekce HIV dochází nejdříve k lokální replikaci v místě vstupu do organismu a následně k vysoké virémii, obvykle během druhého až třetího týdne po expozici. Průkaz virové RNA bez detekovatelných protilátek je jasnou známkou velmi časně infekce, v praxi však bývají tyto záchyty náhodné, nejčastěji u dárců krve nebo plazmy. Proteinová složka virového jádra, antigen p24, je obvykle detekovatelná již během několika dnů od nástupu virémie. S rozvojem protilátkové odpovědi hladina volného antigenu klesá a stává se neměřitelnou. Detekce p24 antigenu v nepřítomnosti anti-HIV protilátky může být také použita jako marker nedávné infekce, ale jeho přítomnost je krátkodobá (1-2 týdny), a proto má omezené použití. U neléčených pacientů dochází v průběhu 8-10 let v souvislosti s progresí onemocnění



a destrukcí hostitelského imunitního systému k opětovné nadprodukci p24 antigenu a svědčí to o špatné prognóze.

Počáteční imunitní odpověď ve formě virově specifických IgM protilátek je variabilní co do intenzity i trvání a obvykle vrcholí během 1-2 týdnů a klesá o další 1-2 týdny později. Současně se vyvíjí dlouhodobá protilátková odpověď ve třídě IgG. V průběhu několika měsíců dochází k postupnému zvyšování titru anti-HIV-1, což je premisou pro některé sérologické testy k identifikaci recentní fáze infekce. Patří mezi ně i jeden z prvních používaných testů, tzv. enzymové imunoanalýzy se sníženou citlivostí (Less Sensitive Enzyme Immunoassays, LS-EIA), známé také jako „rozladěný“/“detuned“ test [22]. Hodnocení tohoto testu vychází z předpokladu, že nedávno infikovaní jedinci budou mít nižší hladiny protilátek proti HIV-1 ve srovnání s pacienty po plné sérokonverzi. Citlivost testu je snižena ředěním vzorku až do hodnoty 1:20 000 a zkrácením inkubační doby. Nedávná infekce je potvrzena v případě, že HIV-1 konfirmačně pozitivní vzorek dává negativní výsledek při testování v podmínkách LS-EIA. Testy z této skupiny, HAVAB 3A11 ELISA (Abbott) a Vironostika HIV microELISA (BioMerieux), již nejsou komerčně dostupné. Konstrukčně v nich byly využity antigeny subtypu B, který je nejběžnějším kmenem HIV-1 cirkulujícím v USA a Evropě. U pacientů s non-B subtypem však měly protilátky sníženou vazebnou schopnost k nehomolognímu antigenu, což vedlo k vyššímu procentu výsledků s falešně nízkou aviditou [23].

Dalším často používaným sérologickým testem je komerčně dostupná Capture Enzyme Immunoassay (BED-CEIA) společnosti Calypte Biomedical, USA [24]. Princip testu je založen na odhadu podílu HIV-1 specifických protilátek třídy IgG na celkovém množství IgG, který je u recentních infekcí nízký. V testu jsou použity peptidy z imunodominantních oblastí glykoproteinu gp41 tří různých kmenů HIV-1, a to subtyp B, CRF\_01AE a D, proto označení BED.

Studie potvrdily, že jednou z dominantních podtříd v časně protilátkové odpovědi na infekci HIV-1 jsou protilátky izotypu IgG3 [25]. Izotyp IgG3 proti p24 antigenu je obvykle přítomen přechodně během prvních 1-4 měsíců onemocnění. Vysoké hladiny IgG3 jsou spojeny také s vysokou virovou náloží HIV-1. Díky tomu se protilátky IgG3 anti-p24 jeví jako slibný biologický marker pro identifikaci nedávných infekcí, bohužel není tato metoda komerčně dostupná. Navíc, ačkoli bylo

pozorováno, že podíl IgG3 časem klesá, přibližně třetina jedinců vykazuje relativně vysoké hladiny i v pozdním stádiu infekce [26].

Pro laboratoře, které v algoritmu konfirmačního vyšetření využívají jako potvrzovací test komerční imunoblot Inno-LIA™ HIV I/II Score (Fujirebio N. V.), je možné pro identifikaci časné fáze infekce využít upravený bodovací systém. Protilátkový vzorec je posuzován na základě intenzity pruhů detekujících protilátky proti rekombinantním peptidům HIV-1 (p17, p24, p31, gp41 a gp120) a HIV-2 (gp36 a gp105) [27].

Jiným přístupem k identifikaci nedávné infekce je testování „zralosti“ protilátkové odpovědi vyšetřováním avidity, která je definovaná jako celková stabilita komplexu protilátky a antigenu. Avidita narůstá s počtem současně se uplatňujících vazebných míst a jejich afinitou, tedy intenzitou interakce mezi protilátkou a antigenem. Pevnost této vazby je primárně ovlivněna slabými molekulárními vazbami (vodíkové vazby, hydrofobní a coulombouvske interakce), koncentrací protilátky a antigenu, teplotou, pH prostředí a v konkrétním případě testu na stanovení avidity rovněž přítomností disociačního činidla. Avidita vypovídá o vyzrálosti protilátek. Na začátku infekci se tvoří nejprve protilátky s nízkou aviditou, která se časem postupně zvyšuje. Tato optimalizace protilátkové odpovědi se označuje jako afinitní maturace. Proces vyzrávání protilátek má dva oddělené, ale související kroky, a to somatickou hypermutaci a následnou klonální selekci. V prvním kroku se B-lymfocyt, který rozezná antigen a dostane pomocné signály od T-lymfocytů, opakovaně dělí a současně dochází k intenzivním náhodným mutacím ve variabilních částech genů kódujících imunoglobulinové řetězce. Frekvence mutací je až  $10^6$  krát větší než v jiných oblastech genomu. Výsledkem je nadprodukce B-lymfocytů, které se liší svou afinitou k antigenu. B-lymfocyty musí soutěžit o růstové faktory a dostupnost antigenu. Přežijí jen ty s nejvyšší afinitou pro antigen, ostatní budou vlivem kompetice z organismu odstraněny. Po několika cyklech selekce mají díky tomu protilátky v krevním oběhu řádově vyšší afinitu, než před ní [28].

Testy avidity jsou součástí standardního vyšetřovacího algoritmu u onemocnění, kde je důležité odlišit primární infekci od reaktivace. Zvláště u těhotných žen, u nichž je primární infekce zarděnkami, toxoplasmou nebo některými herpetickými viry (*Cytomegalovirus*, *Varicella zoster virus*, *Herpes simplex virus*) spojena s vyšším rizikem poškození plodu [29, 30, 31].

Pro stanovení avidity se používá metoda, při níž je vzorek před testem inkubován s chaotropním činidlem (ureou nebo guanidinem), které naruší vodíkové vazby určující sekundární strukturu protilátky a významně tak ovlivní její následnou interakci s antigenem. Účinek je výraznější u časných protilátek, protože jejich aktivní místo má méně definovanou strukturu a může být degradováno již mírnou denaturací, takže jsou méně schopné vázat svůj homologní antigen. Jak zraje protilátková odpověď, aktivní místo se stává odolnějším vůči tomuto narušení. Při hodnocení indexu avidity se porovná úroveň signálu získaného po ošetření vzorku chaotropní látkou se signálem vytvořeným při inkubaci vzorku v neutrálním ředidle, jakým je např. pufovaný fyziologický roztok (PBS). Pokud je protilátka vysoce avidní, budou oba signály v imunochemickém testu velmi podobné. Vazba časných, méně avidních protilátek, bude vlivem chaotropního činidla významně snížena, což ve srovnání s neošetřeným alikvotem, vygeneruje slabší signál [32].

Prvním komerčně dostupným produktem pro měření avidity je The Limiting Avidity test (LAG, Sedia™), který obsahuje nízké koncentrace peptidů kódovaných v imunodominantní oblasti gp41 několika subtypů HIV-1 [33]. V odborné literatuře byly pro výpočet indexu avidity popsány jednoduché modifikace standardně používaných automatizovaných screeningových testů 3. a 4. generace [34].

Využití sérologických testů pro stanovení recentní infekce má několik omezení. Výsledky mohou být významně ovlivněny individuální variabilitou imunitní odpovědi pacientů k různým subtypům HIV-1, antiretrovirovou terapií, která snižuje virovou nálož, a tím i antigenní stimulaci imunitního systému. Selhávání imunitního systému v pokročilém stádiu onemocnění HIV je spojeno s poklesem hladin protilátek proti HIV. Lze tedy očekávat, že tento fakt ovlivní specifitu metod, které závisí na kvantifikaci hladiny protilátek.

Optimálním se jeví algoritmus kombinující sérologické testy, epidemiologická data a v blízké budoucnosti snad také i molekulárně-biologické metody založené na detekci virové diverzity.

## 9. Experimentální část

### 9.1. Metoda stanovení AI testem ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo

Ke stanovení indexu avidity jsme použili modifikaci automatizované metody HIV Ag/Ab Combo (test 4. generace) pro analyzátor Architect (Abbott). Jedná se o chemiluminiscenční imunoanalýzu na mikročásticích (CMIA) ke kvalitativní detekci antigenu p24 a protilátek proti HIV-1 (skupina M a skupina O) a HIV-2. V prvním kroku se antigen p24 a protilátky HIV-1 nebo HIV-2 přítomné ve vzorku vážou na paramagnetické mikročástice potažené monoklonální (myší) protilátkou proti antigenu p24 a protilátkami proti humánním protilátkám anti-HIV-1/HIV-2. Po promytí se vytvořené imunokomplexy vážou s konjugátem značeným akridinem. Po dalším promývacím cyklu se reakční prostředí alkalizuje a do směsi se přidá oxidační činidlo (peroxid vodíku). Následně dochází k oxidaci akridinu za vzniku jeho nestabilní formy v excitovaném stavu. Při přechodu do stabilní formy dochází k uvolnění energie v podobě světla. Výsledná chemiluminiscenční reakce se měří jako relativní světelné jednotky (RLU). Existuje vztah mezi množstvím antigenu a protilátek ve vzorku a hodnotou RLU detekovanou optickým systémem analyzátoru. Reakce se vyhodnocuje na základě porovnání naměřené hodnoty vzorku (S) s hodnotou cut-off (CO) naměřenou při kalibraci (poměr S/CO).

Každý vyšetřovaný vzorek jsme rozdělili do dvou alikvotů, které byly testovány paralelně. První alikvot (B) jsme ředili v poměru 1:10 pufovaným fyziologickým roztokem (PBS, pH 7,4) a druhý alikvot (G) ve stejném poměru 1M roztokem guanidin hydrochloridu. Po pětiminutové inkubaci při pokojové teplotě jsme alikvoty testovali dle standardního protokolu výrobce. Index avidity (AI) jsme počítali podle vzorce:

$$AI = \frac{S/CO \text{ alikvot G}}{S/CO \text{ alikvot B}}$$

tedy jako poměr hodnoty naměřené pro alikvot G ošetřený guanidinem k hodnotě alikvotu B s fyziologickým roztokem.

## 9.2. Charakteristika analytického souboru

Soubor byl vybrán ze sér archivovaných v NRL pro HIV/AIDS. Soubor tvořilo 98 sér od pacientů s HIV infekcí v akutním stadiu infekce (od 93 pacientů) a pacientů v symptomatickém stadiu non-AIDS nebo AIDS (275 sér od 121 pacientů). Stanovení AI v části souboru z akutního stadia, ve které se očekávaly nízké hodnoty AI, a podsouboru symptomatických pacientů s očekávanými vysokými hodnotami AI poskytlo data pro statistickou analýzu distribuce hodnot AI a určení rozhodovací meze (cut-off) k odlišení akutních infekcí od pozdějších stadií. Podsoubor sér pacientů s akutní infekcí byl vybrán na podkladě v současnosti využívaných údajů o časnosti HIV infekce v rámci surveillance. Jsou to jednak údaje klinické (příznaky akutního retrovirového syndromu), data epidemiologická o negativitě vyšetření na HIV v nedávné době a údaje laboratorní, zejména průkaz antigenu p24 a slabé či nekompletní reaktivitě protilátek v metodě westernblot. Zohledňují se i kombinace těchto údajů.

Soubor 214 pacientů analytického souboru tvořilo 200 mužů (93,5 %) a 14 žen (6,5 %). Průměrný věk pacientů byl 38,7 let. V tabulce 5 je uvedeno zastoupení subtypů HIV. Subtyp nebyl znám u 64 pacientů tj. 29,9 %. V podskupině se známým subtypem byl nejvíce zastoupen subtyp B (78,0 %) a následně subtyp A (8,7 %).

**Tabulka 5** - Zastoupení subtypů HIV v analytickém souboru

<b>Subtyp HIV</b>	<b>Četnost</b>	<b>Procento</b>
A	13	8,7
CRF01AE	4	2,7
CRF02AG	3	2,0
B	117	78,0
C	1	0,6
jiné	12	8,0
celkem	150	100

### 9.3. Vyhodnocení indexu avidity jako ukazatele akutního stadia na podkladě vyšetření analytického souboru

Vyhodnocení se provádí pomocí ROC křivky (Receiver Operating Characteristic), která ukazuje vztah mezi senzitivitou a specificitou (přesněji její transformací, 1-specificitou). Tento postup se běžně používá v kontextu screeningových a diagnostických testů, kde hodnotí kvality testu ve vztahu k rozpoznání přítomnosti onemocnění. V našem případě byl postup oprávněně aplikován k rozlišení stadia onemocnění. Výpočet senzitivity a specificity dává do vztahu „skutečnost“ (v tomto případě představovanou klasifikací do výše uvedených dvou skupin: akutní stadium vs. symptomatické non-AIDS/AIDS stadium) a dichotomizovanou hodnotu indexu avidity. ROC křivka ukazuje, jak se mění senzitivita a specificita v závislosti na volbě rozhodovací meze (cut-off) použité pro dichotomizaci indexu avidity. Hodnoty pod cut-off se pak berou jako indikace akutní fáze infekce.

K hledání optimální rozhodovací meze indexu avidity rozlišující mezi akutními a neakutními stadii se používají různé metody vycházející ze senzitivity a specificity. V této analýze byly použity tři z nich:

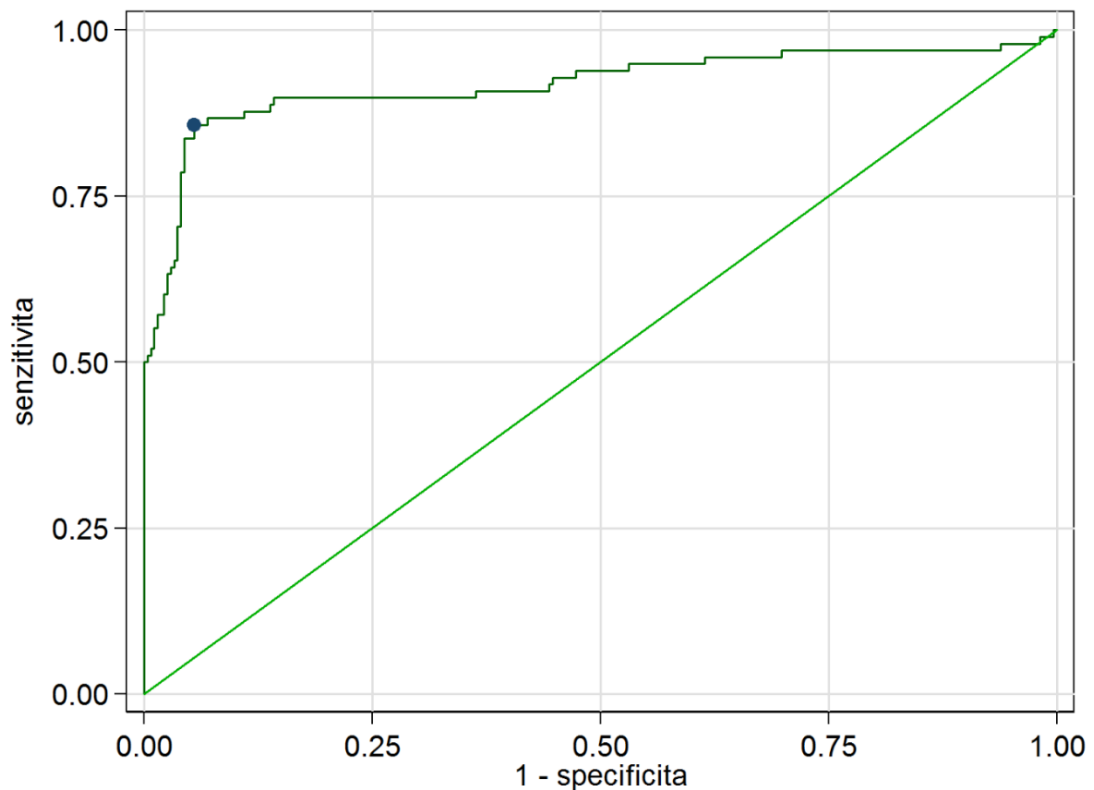
Youdenova metoda maximalizuje součet senzitivity a specificity, Liuova metoda maximalizuje součin senzitivity a specificity, třetí metoda určuje hraniční hodnotu jako bod, který je v grafu ROC křivky nejbližší souřadnému bodu [0,1] odpovídajícímu perfektní senzitivě a specificitě [35, 36, 37].

Všechny tři metody daly velmi podobné výsledky, dále jsou uvedeny především výpočty vycházející z Youdenova indexu.

Odhad rozhodovací meze postupem podle Youdena vyšel jako 0,734 s 95% intervalem spolehlivosti (0,678; 0,790). Liuova metoda dala stejnou hodnotu 0,734 a metodou hodnoty nejbližší bodu [0,1] vyšlo 0,755.

Obrázek 14 zobrazuje ROC křivku s vyznačením bodu, který odpovídá rozhodovací mezi odvozené na základě Youdenova indexu. Čím více se křivka přibližuje levému hornímu rohu obrázku, tím má zkoumaný ukazatel (zde avidita) větší schopnost odlišovat dva stavy (zde akutní a neakutní stadium). Čím více se křivka přibližuje k diagonální čáře, tím je diskriminační schopnost ukazatele horší. Diagonála odpovídá situaci, kdy by vzorky byly náhodně označovány za pozitivní či negativní.

ROC křivka získaná naší analýzou ukazuje, že schopnost indexu avidity rozlišit akutní a neakutní stádia infekce HIV je dobrá, což dokládá ukazatel plochy pod křivkou, který je roven 0,901 (při maximální možné hodnotě 1).



**Obrázek 14** - Graf vyhodnocení závislosti senzitivity a specifity (ROC křivka)

V tabulkách 6 a 7 je ilustrována funkčnost rozpoznávání akutního stadia podle aviditního indexu. V řádcích tabulky 6 je skupina akutních případů a skupina symptomatických non-AIDS/AIDS, ve sloupcích je rozlišení podle indexu avidity na základě vypočteného cut-off. Falešně akutních na základě indexu avidity bylo 15 vzorků neakutních pacientů podle surveillance s nízkou aviditou a falešně neakutních bylo 14 vzorků akutních pacientů s vysokou aviditou. Správnost testu, což je podíl správně klasifikovaných, ať už akutních či neakutních vzorků z celku, dosáhla 92,2 % [38].

V tabulce 7 je vidět, že s vypočtenou hraniční hodnotou AI bylo dosaženo senzitivity 85,7 % a specifity 94,5 %.

**Tabulka 6** - Porovnání klasifikace vzorků podle surveillance a indexu avidity

	index avidity (AI)		Celkem
	AI ≤ 0.734	AI > 0.734	
Data ze surveillance			
Akutní stadium	84	14	98
Neakutní stadium	15	260	275
Celkem	99	274	373

**Tabulka 7** - Charakteristiky testu založeného na indexu avidity v analytickém souboru

Charakteristika	Hodnota charakteristiky	95% interval spolehlivosti
Senzitivita	85,7 %	(77,2 %; 92,0 %)
Specifická	94,5 %	(91,2 %; 96,9 %)
Podíl falešně pozitivních	5,5 %	(3,1 %; 8,8 %)
Podíl falešně negativních	14,3 %	(8,0 %; 22,8 %)
Správnost	92,2 %	(89,0 %; 94,7 %)
Plocha pod ROC křivkou	0,901	(0,864; 0,939)

#### 9.4. Charakteristika testovacího souboru

Pro ověření použitelnosti stanovení avidity protilátek proti HIV pro rozpoznání akutního stadia infekce byl vytvořen soubor sér ze vzorků 432 pacientů nově diagnostikovaných v průběhu let 2014 a 2015. Soubor zahrnoval pouze vzorky získané hned při záchytu infekce. Pacienti při záchytu měli infekci v různých stadiích (akutním, chronickém, symptomatickém non-AIDS nebo AIDS) určených běžným postupem v rámci surveillance (viz kapitola 7.2). Ze 432 pacientů bylo 395 mužů (91,4 %) a 37 žen (8,6 %). Průměrný věk pacientů byl 34,9 let. V tabulce 8 je uvedena četnost záchytu subtypů HIV (subtyp nebyl stanoven u 136 tj. 31,9 %). Nejvíce zastoupeným byl subtyp B (75,9 %), dále subtyp A (10,2 %).



**Tabulka 8** - Četnost subtypů HIV v testovacím souboru.

Subtyp HIV	Četnost	Procento
A	30	10,2
CRF01AE	3	1,0
CRF02AG	3	1,0
B	223	75,9
C	2	0,7
F	1	0,3
jiný	32	10,9
celkem	294	100

### **9.5. Výsledky stanovení indexu avidity jako možného ukazatele akutního stadia infekce HIV**

Avidita protilátek ve vzorcích souboru byla stanovena metodou podle bodu 9.1. Pro vyhodnocení výsledků vyšetření testovacího souboru byla použita rozhodovací mez indexu avidity 0,734 stanovená na podkladě statistického vyhodnocení výsledků stanovení AI u analytického souboru v kap. 9.3.

Určení akutního stadia infekce HIV v testovacím souboru na podkladě dosud používaných údajů pro surveillance bylo porovnáno s výsledky stanovení avidity protilátek. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 9.

**Tabulka 9** - Určení akutního a neakutního stadia infekce HIV postupem dle surveillance a dle stanovení indexu avidity (čísla uvádí počty pacientů)

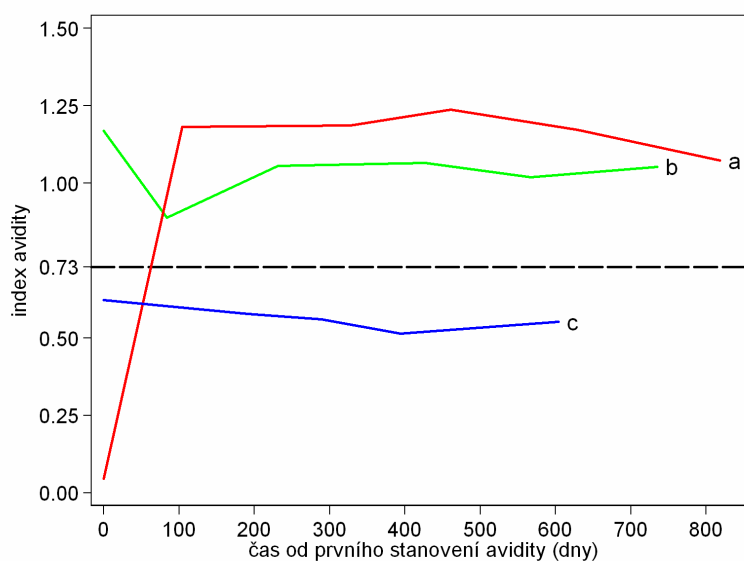
	index avidity (AI)		celkem
	AI ≤ 0.734	AI > 0.734	
Data ze surveillance			
Akutní stadium	42	12	54
Neakutní stadium	64	314	378
Celkem	106	326	432

V tabulce 10 je vidět, že pro testovací soubor bylo s mezí odvozenou z dat analytického souboru dosaženo senzitivity 77,8 % a specificity 83,1 %.

**Tabulka 10** - Charakteristiky testu založeného na indexu avidity v testovacím souboru

Charakteristika	Hodnota charakteristiky	95% interval spolehlivosti
Senzitivita	77,8 %	(64,4 %; 88,0 %)
Specificita	83,1 %	(78,9 %; 86,7 %)
Podíl falešně pozitivních	16,9 %	(13,3 %; 21,1 %)
Podíl falešně negativních	22,2 %	(12,0 %; 35,6 %)
Správnost	82,4 %	(78,5 %; 85,9 %)
Plocha pod ROC křivkou	0,804	(0,745; 0,863)

Obrázek 15 ukazuje pro ilustraci tři modelové příklady s rozdílnou dynamikou změn indexu avidity v čase. Pacient „a“ představuje očekávaný vývoj indexu avidity u akutních případů. Pacient „b“ ilustruje možnou dynamiku u případů zachycených v neakutním stádiu. Ojedinele se vyskytují pacienti s atypickým průběhem (křivka „c“), kde se ani v průběhu dlouhodobého sledování nedostane index avidity nad rozhodovací mez a nelze ho tedy použít jako pomocné kritérium pro upřesnění stádia onemocnění v době záchytu.



**Obrázek 15** - Vybrané příklady rozdílné dynamiky změn indexu avidity v čase: a-akutní, b-chronický, c-atypický (bližší popis v textu)

## 10. Diskuze

Dva vytvořené soubory sér (analytický a testovací) mají podobné základní charakteristiky. Nízký podíl žen odpovídá epidemiologické situaci v ČR. Průměrný věk v testovacím souboru je nižší - 34,9 let oproti hodnotě 38,7 let v analytickém souboru, což pravděpodobně souvisí se zahrnutím asymptomatických pacientů do souboru.

Rozhodovací mez odvozená na základě analytického souboru poměrně dobře odpovídá mezím zjištěným v dříve publikovaných studiích, jak těch, které využívají stejnou automatizovanou metodu (Abbott Architect) [34] a disociační činidlo (guanidin), tak těch, které využívají jinou metodu (Biorad) a jiné činidlo (močovina) [39].

Navíc se ukázalo, že při zpracování našeho analytického souboru vedly tři statistické postupy stanovení meze podle různých kritérií, vycházejících ze senzitivity a specifity, k prakticky stejným výsledkům.

Testovací soubor zahrnuje širší spektrum pacientů ve všech stádiích onemocnění oproti úzce vybranému analytickému souboru omezenému na výrazně odlišené skupiny akutních a symptomatických pacientů. Tato skutečnost pochopitelně ovlivnila schopnost aviditního testu odlišit akutní a neakutní stádium. To se projevuje méně příznivými charakteristikami senzitivity, specifity a správnosti.

U některých jedinců nelze vyloučit, že vzhledem k nedostatku informací pro posouzení akutního stadia (bezpříznakový klinický stav, chybějící informace epidemiologického charakteru, nejednoznačný laboratorní nález) nedošlo ke správnému určení stadia v rámci surveillance.

Závěry několika studií ukazují, že časná antiretrovirová léčba může zpomalit zrání protilátek, protože k jejich maturaci dochází pouze v průběhu aktivní virové replikace [40,41].

Na druhou stranu, literární údaje naznačují, že hodnota indexu avidity může být falešně zvýšená u vzorků v časných stádiích infekce s pozitivním antigenem p24 kvůli vysoké afinitě anti-p24 monoklonálních protilátek používaných v testovacích soupravách [34].

Dalším faktorem, který může ovlivnit výsledek testu avidity je subtyp HIV. Dle dostupných údajů je to především nízká avidita protilátek proti subtypu D,

a to i u pacientů dlouhodobě infikovaných [42]. Stanovení subtypu HIV se získává jako vedlejší informace při stanovení rezistence HIV na antivirotika, pouze na základě indikace lékaře specializovaného HIV centra, není tedy dostupná u všech nově zachycených případů. Výskyt subtypu D je v ČR velmi vzácný (0,24 %), a proto nemůže výsledky stanovení indexu avidity v testovaném souboru výrazně ovlivnit.

Identifikace akutních nebo nedávno infikovaných osob a jejich okamžitá léčba přispívá podstatně ke snížení dalšího přenosu HIV, což je hlavním cílem všech preventivních i intervenčních programů. Stanovení indexu avidity pomocí automatizovaného testu na analyzátoru Architect s manuální preanalytickou úpravou vzorku je jednoduchou metodou, která může přispět k přesnějšímu určení časné fáze infekce.

## 11. Závěr

Provedená studie naznačuje, že index avidity je užitečný ukazatel k odhalení akutní infekce, byť jeho vypovídací schopnost zdaleka není absolutní, jak naznačují zjištěné hodnoty senzitivity a specifity. Může být nicméně užitečný jako doplněk ostatních markerů akutní infekce používaných v rámci systému surveillance. Důležitým přínosem je, že index může mít indikační hodnotu v případě, že běžné údaje ze surveillance nejsou k dispozici nebo jsou nejednoznačné.

Zkušenosti z jiných pracovišť ukazují, že index avidity je využitelný pro odhalení akutních případů infekce HIV v prevalenčních studiích i v systémech surveillance [39]. Na základě výsledků naší studie bude metoda zavedena do běžné laboratorní praxe, ale nadále se budou analyzovat faktory, které mohou výpovědní hodnotu a praktické využití aviditního indexu ovlivňovat.

## 12. Seznam zkratek

3TC	lamivudin
ABC	abacavir
AI	index avidity
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome syndrom získaného selhání imunity
ART	antiretroviróvá terapie
AZT	azidothymidin
BED – CEIA	capture enzyme immunoassay
CD	cluster of designation diferenciační skupina
CDC	centrum pro kontrolu a prevenci nemocí
CE	evropská certifikace
CMIA	chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročásticích
CO	cutt-off
CRSS	Consortium for Retrovirus Serology Standardization
ČR	Česká republika
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DRV	darunavir
DTV	dolutegravir
ECDC	Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí
EI	inhibitory vstupu
EIA	enzyme immunosorbent assay
ELISA	enzyme – linked immunosorbent assay
EU/EEA	Evropská unie/Evropský hospodářský prostor
FI	inhibitory fúze
FTC	emtricitabin
HAART	highly active antiretroviral therapy vysoko účinná antiretroviróvá terapie
HIV	human imunodeficiency virus virus lidské imunitní nedostatečnosti
HTLV	lidský T-lymfotropní virus

INSTI	inhibitory integrázy
LA <sub>g</sub>	The Limiting Avidity test
LAV	lymphadenopathy associated virus virus lymfadenopatie
LS-EIA	Less Sensitive Enzyme Immunoassays
MSM	muži mající sex s muži
NA	nucleid acid nukleová kyselina
NAT	nucleic acid test
NNRTI	nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy
NRL pro HIV/AIDS	Národní referenční laboratoř pro HIV/AIDS
NRTI/NtRTI	nukleosidové/nukleotidové inhibitory reverzní transkriptázy
PBS	phosphate-buffered saline fyziologický roztok pufrovaný fosfátem
PCR	polymerase chain reaction polymerázová řetězová reakce
PEP	postexpoziční profylaxe
PI	inhibitory proteáz
PrEP	pre-expoziční profylaxe
r	ritonavir
RAL	raltegravir
RLU	relativní světelná jednotka
RNA	ribonukleová kyselina
RT	reverzní transkriptáza
ROC	Receiver Operating Characteristic operační charakteristika přijímače
SIV	Simian immunodeficiency virus virus opičí imunodeficiencie
ssDNA	single stranded jednovláknová DNA
STARHS	Serological Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversion
SZÚ	Státní zdravotní ústav
TAF	tenofovir alafenamid fumarát
TDF	tenofovir disoproxil fumarát

### 13. Seznam literatury

1. FEE, E., BROWN, T. M. Michael S. Gottlieb and the Identification of AIDS. *American Journal of Public Health*, **2006**, vol. 96, n. 6, p. 982-983. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1470620>
2. ZHU, T., KORBEL, B. T., NAHMIAS, A. J., HOOPER, E., SHARP, P. M., HO, D. D. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature*, **1998**, vol. 391, n. 6667, p. 594-597.
3. SEDLÁČEK, D. Novinky v léčbě infekce HIV/AIDS. *Remedia*, **2016**, vol. 26, n. 5.
4. ROZSYPAL, H., STAŇKOVÁ, M., SEDLÁČEK, D., SNOPOKOVÁ, S., KAPLA, J., ASTER, V., MACHALA, L., JILICH, D., DLOUHÝ, P., KOLČÁKOVÁ, J., ZJEVÍKOVÁ, A., JERHOTOVÁ, Z., OLBRECHTOVÁ, L. *Doporučený postup péče o dospělé infikované HIV a postexpoziční profylaxe infekce HIV*. [online] listopad **2012**. Společnost infekčního lékařství České lékařské společnosti J. E. Purkyně. [cit. 2020-05-24]. Dostupné z: <https://www.infekce.cz/DoporART12.htm>
5. JILICH, D., KULÍŘOVÁ, V. *et al. HIV infekce - Současné trendy v diagnostice, léčbě a ošetřovatelství*. 1. vydání. Praha: Mladá fronta, **2014**. p. 46. ISBN 978-80-204-3325-1.
6. BRŮČKOVÁ, M. 30 let od popsání prvních případů AIDS: historie a současnost. *Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie (SZÚ, PRAHA)*, **2012**, vol. 21, n. 2, p. 59-60. Dostupné z: [http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy\\_EM/21\\_2012/02\\_unor/058\\_aids\\_II.pdf](http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy_EM/21_2012/02_unor/058_aids_II.pdf)
7. RAMBAUT, A., POSADA, D., CRANDALL, K. A., HOLMES, E. C. The causes and consequences of HIV evolution. *Nature Reviews Genetics*, **2004**, vol. 5, p. 52-61.
8. ROZSYPAL, H. *AIDS – klinický obraz a léčba*. 1. vydání. Praha, Maxdorf, **1998**. p. 49. ISBN 80-85800-92-6.
9. VAŇOUSOVÁ, D., JILICH, D., MACHALA, L., HÓSOVÁ, M., POCK, L., ROZSYPAL, H., STAŇKOVÁ, M., HERCOGOVÁ, J. Úskalí diagnostiky Kaposiho sarkomu sdruženého s HIV infekcí. *Klinická onkologie*, **2010**, vol. 23, n. 5, p. 285-292. ISSN: 0862-495X; 1802-5307 (elektronická verze).



10. JILICH, D., KULÍŘOVÁ, V. *et al.* *HIV infekce - Současné trendy v diagnostice, léčbě a ošetřovatelství*. 1. vydání. Praha: Mladá fronta, **2014**. p. 59-66. ISBN 978-80-204-3325-1.
11. MAREŠOVÁ, M. *Tisková zpráva Národní referenční laboratoře pro HIV/AIDS. Trendy vývoje a výskyt HIV/AIDS v ČR v roce 2019*. [online] 29. leden 2020. Státní zdravotní ústav. [cit. 2020-05-24]. Dostupné z <http://www.szu.cz/tema/prevence/tiskova-zprava-nrl-pro-hiv-aids-trendy-vyvoje-a-vyskyt-hiv-3?highlightWords=tiskov%C3%A1+zpr%C3%A1va+hiv>
12. MAREŠOVÁ, M. *Grafy k tiskové zprávě NRL pro HIV/AIDS. Trendy vývoje a výskyt*. [online] 29. leden 2020. Státní zdravotní ústav. [cit. 2020-05-24]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/tiskova-zprava-nrl-pro-hiv-aids-trendy-vyvoje-a-vyskyt-hiv-3?highlightWords=tiskov%C3%A1+zpr%C3%A1va+hiv>
13. MRAVČÍK, V., CHOMYNOVÁ, P., GROHMANNOVÁ, K., JANÍKOVÁ, B., ČERNÍKOVÁ, T., ROUS, Z., TION LEŠTINOVÁ, Z., NECHANSKÁ, B., CIBULKA, J., FIDESOVÁ, H., VOPRAVIL, J. *Výroční zpráva o stavu ve věcech drog v České republice v roce 2018*. [online] Praha, září **2019**. Národní monitorovací středisko pro drogy a závislosti. Sekretariát Rady vlády pro koordinaci protidrogové politiky. [cit. 2020-05-24]. Dostupné z: [https://www.drogy-info.cz/data/obj\\_files/33122/871/VZdrogy2018\\_web%202020-01-13\\_V02.pdf](https://www.drogy-info.cz/data/obj_files/33122/871/VZdrogy2018_web%202020-01-13_V02.pdf)
14. The INSIGHT START Study Group. Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. *The New England Journal of Medicine*, **2015**, vol. 373, p. 795-807. DOI: 10.1056/NEJMoa1506816.
15. STAŇKOVÁ, M., SKOKANOVÁ, V. Problematika HIV/AIDS – ohlédnutí a perspektivy. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, **2004**, vol. 10, n. 2, p. 56-60. Dostupné z <http://www.remedia.cz/Clanky/Prehledy-nazory-diskuse/Soucasne-moznosti-antiretrovirove-lecby/6-F-1Wx.magarticle.aspx>
16. COHEN, M. S., CHEN, Y. Q., MCCAULEY, M., *et al.* Antiretroviral Therapy for the Prevention of HIV-1 Transmission. *The New England Journal of Medicine*, **2016**, vol. 375, n. 9, p. 830-839.

17. Zákon č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů. In: *Sbírka zákonů*. 11. 8. 2000. ISSN 1211-1244.
18. JANVIER, B., BAILLOU, A., ARCHINARD, P., MOUNIER, M., MANDRAND, B., GOUDEAU, A., BARIN, F. Immune response to a major epitope of P24 during infection with human immunodeficiency virus type 1 and implications for diagnosis and prognosis. *Journal of clinical microbiology*, **1991**, vol 29, n. 3, p. 488-492.
19. VERCAUTEREN, G., PIOT, P., VANDENBRUAENE, M., VAN DER GROEN, G. Evaluation of two enzyme immunoassays for detection of human immunodeficiency virus antigen in African and European sera. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious diseases*, **1989**, n. 8, p. 892-895.
20. VOLZ, E. M., IONIDES, E., ROMERO-SEVERSON, E., BRANDT, M.-G., MOKOTOFF, E., KOOPMAN, J. S. HIV-1 transmission during early infection in men who have sex with men: A phylodynamic analysis. *PLOS Medicine*, **2013**, vol. 10, n. 12, e1001568.
21. COHEN, M. S., CHEN, Y. Q., MCCAULEY, M., GAMBLE, T., HOSSEINIPOUR, M. C., KUMARASAMY, N., HAKIM, J. G., KUMWENDA, J., GRINSZTEJN, B., PILOTTO, J. H. *et al.* Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *The New England Journal of Medicine*, **2011**, n. 365, p. 493-505.
22. JANSSEN, R. S., SATTEN, G. A., STRAMER, S. L., RAWAL, B. D., O'BRIEN, T. R., WEIBLEN, B. J., HECHT, F. M., JACK, N., CLEGHORN, F. R., KAHN, J. O., CHESNEY, M. A., BUSCH, M. P. New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes. *The Journal of the American Medical Association*, **1998**, vol. 280, n. 1, p. 42-48.
23. YOUNG, C. L., HU, D. J., BYERS, R., VANICHSENI, S., YOUNG, N. L., NELSON, R., MOCK, P. A., CHOOPANYA, K., JANSSEN, R., MASTRO, T. D., MEI, J. V. Evaluation of a sensitive/less sensitive testing algorithm using the bioMerieux Vironostika-LS assay for detecting recent HIV-1 subtype B or E infection in Thailand. *AIDS Research and Human Retroviruses*, **2003**, vol. 19, n. 6, p. 481-486.

24. BARIN, F., MEYER, L., LANCAR, R., DEVEAU, C., GHARIB, M., LAPORTE, A., DESENCLOS, J. C., COSTAGLIOLA, D. Development and validation of an immunoassay for identification of recent human immunodeficiency virus type 1 infections and its use on dried serum spots. *Journal of Clinical Microbiology*, **2005**, vol. 43, n. 9, p. 4441-4447.
25. WILSON, K., JOHNSON, E. I., CROOM, H. A., RICHARDS, K. M., DOUGHTY, L., CUNNINGHAM, P. H. Incidence immunoassay for distinguishing recent from established HIV-1 infection in therapy-naive populations. *AIDS*, **2004**, vol. 18, n. 17, p. 2253-2259.
26. CURTIS, K. A., AMBROSE, K. M., KENNEDY, M. S., OWEN, S. M. Evaluation of dried blood spots with a multiplex assay for measuring recent HIV-1 infection. *PLoS ONE*, **2014**, vol. 9, e107153.
27. SCHUPBACH, J., GEBHARDT, M. D., TOMASIK, Z., NIEDERHAUSER, C., YERLY, S., BURGISSER, P., MATTER, L., GORGIEVSKI, M., DUBS, R., SCHULTZE, D., STEFEN, I., ANDREUTTI, C., MARTINETTI, G., GÜNTERT, B., STAUB, R., DANEEL, S., VERNAZZA, P. Assessment of recent HIV-1 infection by a line immunoassay for HIV-1/2 confirmation. *PLoS*, **2007**, vol. 4, e343.
28. HOŘEJŠÍ, V., BARTŮŇKOVÁ J., BRDIČKA, T., SPÍŠEK, R. *Základy imunologie*. 4. vydání. Praha: Triton, **2009**. 316 s. ISBN 978-80-7553-250-3.
29. OZEKINCI, T., SUAY, A., KARASAHIN, O., AKPOLAT, A. The Value of CMV and Rubella IGG Avidity Tests in the Diagnosis of Cytomegalovirus (CMV) and Rubella Infections in Pregnant Women. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **2005**, vol. 19, n. 3, p. 139-144.
30. ROUBALOVÁ, K. Laboratorní diagnostika herpetických virů. *Medicína pro praxi*, **2010**, vol. 7, n. 5, p. 241-244.
31. JENUM, P. A., STRAY-PEDERSEN, B., GUNDERSEN, A. G. Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. *Journal of Clinical Microbiology*, **1997**, vol. 35, n. 8, p. 1972-1977.
32. SMOLEN-DZIRBA, J., WASIK, T. J. Current and future assays for identifying recent HIV infections at the population level. *Medical Science Monitor*, **2011**, vol. 17, n. 5, p. 124-133.

33. DUONG, Y. T., QIU, M., DE, A. K., JACKSON, K., DOBBS, T., KIM, A. A., NKENGASONG, J. N., PAREKH, B. S. Detection of recent HIV-1 infection using a new limiting-antigen avidity assay: Potential for HIV-1 incidence estimates and avidity maturation studies. *PLoS ONE*, **2012**, vol. 7, n. 3, e33328.
34. SULIGOI, B., RODELLA, A., RAIMONDO, M., REGINE, V., TERLENGHI, L., MANCA, N., CASARI, S., CAMONI, L., SALFA M. C., GALLI, C. Avidity Index for anti-HIV antibodies: comparison between third- and fourth-generation automated immunoassays. *Journal of Clinical Microbiology*, **2011**, vol. 49, n. 7, p. 2610-2613. 10.1128/JCM.02115-10.
35. FLUSS, R., FARAGGI, D., REISER, B. Estimation of the Youden index and its associated cutoff point. *Biometrical Journal*, **2005**, vol. 47, n. 4, p. 458-472.
36. LIU, X. Classification accuracy and cut point selection. *Statistic in Medicine*, **2012**, vol. 31, n. 23, p. 2676-2686.
37. YODEN, W. J. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*, **1950**, vol. 3, n. 1, p. 32-35.
38. DUŠEK, L., PAVLÍK, T., JARKOVSKÝ, J., KOPTÍKOVÁ, J. Analýza dat v neurologii XXV. Hodnocení diagnostických testů – senzitivita a specificita. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, **2011**, vol. 74/107, n. 1, p. 97-103.
39. SHEPHERD, S. J., MCALLISTER, G., KEAN, J., WALLACE, L. A., TEMPLETON, K. E., GOLDBERG, D. J., GUNSON, R. N., AITKEN, C. Development of an avidity assay for detection of recent HIV infections. *Journal of Virological Methods*, **2015**, vol. 1, n. 217, p. 42-49. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.02.016.
40. SELLERI, M., ORCHI, N., ZANIRATTI, M. S., BELLAGAMBA, R., CORPOLONGO, A., ANGELETTI, C., IPPOLITO, G., CAPOBIANCHI, M. R., GIRARDI, E. Effective highly active antiretroviral therapy in patients with primary HIV-1 infection prevents the evolution of the avidity of HIV-1-specific antibodies. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, **1999**, vol. 46, n. 2, p. 145-150.
41. ADALID-PERALTA, L., GRANGEOT-KEROS, L., RUDENT, A., NGO-GIANG-HUONG, N., KRZYSIEK, R., GOUJARD, C., DEVEAU, C., LE GALL, M., EMILIE, D., ROUZIOUX, C. Impact of highly active antiretroviral therapy on the maturation of anti-HIV-1 antibodies during primary HIV-1

infection. *HIV Medicine*, **2006**, vol. 7, n. 8, p. 514-519. 10.1111/j.1468-1293.2006.00406.x.

42. LONGOSZ, A. F., SERWADDA, D., NALUGODA, F., KIGOZI, G., FRANCO, V., GRAY, R. H., QUINN, T. C., ESHLEMAN, S. H., LAEYENDECKER, O. Impact of HIV subtype on performance of the limiting antigen-avidity enzyme immunoassay, the bio-rad avidity assay, and the BED capture immunoassay in Rakai, Uganda. *AIDS Research and Human Retroviruses*, **2014**, vol. 30, n. 4, p. 339-344.

## 14. Seznam obrázků

<b>Obrázek 1</b> - Struktura virionu HIV .....	12
<b>Obrázek 2</b> - Organizace genomu HIV .....	13
<b>Obrázek 3</b> - Replikační cyklus viru HIV a možnosti farmakologické intervence.....	15
<b>Obrázek 4</b> - Nové případy infekce HIV v roce 2018 v Evropě, relativní údaje na 100 000 obyvatel .....	17
<b>Obrázek 5</b> - Počty nových případů infekce HIV v ČR v jednotlivých letech, absolutní údaje k 31. 12. 2019 .....	18
<b>Obrázek 6</b> - Nové případy HIV v ČR podle země původu, absolutní počty a relativní zastoupení v období 1. 1. 1995 – 31. 12. 2019 .....	18
<b>Obrázek 7</b> - Nové případy HIV v ČR podle stádia v době záchytu, relativní zastoupení v období 1. 1. 2000 – 31. 12. 2019 .....	19
<b>Obrázek 8</b> - Nově diagnostikované případy HIV v EU/EEA v r. 2018 podle zemí a způsobu přenosu v procentech.....	20
<b>Obrázek 9</b> - Rozdělení HIV pozitivních případů v ČR podle způsobu přenosu, údaje za rok 2019.....	20
<b>Obrázek 10</b> - Absolutní počty těhotenství u HIV pozitivních žen, kumulativní údaje k 31.12.2019.....	21
<b>Obrázek 11</b> - ELISA – odečet výsledků spektrofotometrem.....	29
<b>Obrázek 12</b> - Snímek plně rozvinutého vzorce protilátkové odpovědi anti-HIV-1, test New LAV Blot (Biorad).....	30
<b>Obrázek 13</b> - Anti-HIV reaktivní výsledek - rychlotesty od několika výrobců .....	31
<b>Obrázek 14</b> - Graf vyhodnocení závislosti senzitivity a specifity (ROC křivka).....	39
<b>Obrázek 15</b> - Vybrané příklady rozdílné dynamiky změn indexu avidity v čase: a- akutní, b-chronický, c-atypický.....	42

## 15. Seznam tabulek

<b>Tabulka 1</b> - Strukturální geny HIV .....	13
<b>Tabulka 2</b> - Regulační geny HIV.....	14
<b>Tabulka 3</b> – Výčet jednotlivých skupin antivirotik a jejich zástupci .....	24
<b>Tabulka 4</b> - Antiretrovirotika pro základní kombinaci.....	24
<b>Tabulka 5</b> - Zastoupení subtypů HIV v analytickém souboru.....	37
<b>Tabulka 6</b> - Porovnání klasifikace vzorků podle surveillance a indexu avidity.....	40
<b>Tabulka 7</b> - Charakteristiky testu založeného na indexu avidity v analyt. souboru .....	40
<b>Tabulka 8</b> - Četnost subtypů HIV v testovacím souboru. ....	41
<b>Tabulka 9</b> - Určení akutního a neakutního stadia inf. HIV postupem dle surveillance. 41	
<b>Tabulka 10</b> - Charakteristiky testu založeného na indexu avidity v test. souboru .....	42