

Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

HIV a nemoc AIDS Přehled současných diagnostických  
metod

( bakalářská práce )

Vedoucí katedry: Doc.RNDr.Vladimír Semecký,CSc.

Školitel bakalářské práce: Mgr. Klára Konečná

Školitel – specialista bakalářské práce: prim. MUDr. Ladislav Tichý

Vypracovala: Eva Dohnalová

Hradec Králové  
2008

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

.....

Touto cestou bych chtěla poděkovat všem, kteří svými cennými připomínkami, radami a odbornými materiály přispěli k vypracování této bakalářské práce. Zejména bych chtěla poděkovat Mgr. Kláře Konečné a prim. MUDr. Ladislavu Tichému.

## **OBSAH:**

<b>1. CÍL PRÁCE .....</b>	<b>- 5 -</b>
<b>1.1. SOUHRN .....</b>	<b>- 6 -</b>
<b>1.1. SUMMARY .....</b>	<b>- 6 -</b>
<b>1.2. ÚVOD .....</b>	<b>- 7 -</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST A: HIV / AIDS .....</b>	<b>- 8 -</b>
<b>2.1. DEFINICE HIV/AIDS.....</b>	<b>- 8 -</b>
<b>2.2. HISTORIE ONEMOCNĚNÍ .....</b>	<b>- 8 -</b>
<b>2.3. TAXONOMIE HIV .....</b>	<b>- 9 -</b>
<b>2.4. STRUKTURA VIRIONU.....</b>	<b>- 10 -</b>
<b>2.5. PŘENOS INFEKCE .....</b>	<b>- 11 -</b>
<b>2.6. PATOGENEZE HIV INFEKCE .....</b>	<b>- 13 -</b>
<b>2.7. KLASIFIKACE INFEKCE HIV .....</b>	<b>- 14 -</b>
<b>2.8. AKUTNÍ A CHRONICKÁ FÁZE INFEKCE HIV .....</b>	<b>- 16 -</b>
<b>2.9. SOUČASNÁ LÉČBA HIV INFEKCE .....</b>	<b>- 17 -</b>
<b>2.9.1. POSTEXPOZIČNÍ PROFYLAXE .....</b>	<b>- 19 -</b>
<b>3. TEORETICKÁ ČÁST B: HIV / AIDS .....</b>	<b>- 20 -</b>
<b>3.1. DIAGNOSTIKA HIV INFEKCE .....</b>	<b>- 20 -</b>
<b>3.2. MATERIÁL .....</b>	<b>- 20 -</b>
<b>3.3. PŘÍMÝ PRŮKAZ .....</b>	<b>- 21 -</b>
<b>3.4. NEPŘÍMÝ PRŮKAZ.....</b>	<b>- 23 -</b>
<b>3.5. PRINCIPY METOD .....</b>	<b>- 27 -</b>
<b>3.5.1. PCR .....</b>	<b>- 27 -</b>
<b>3.5.2. EIA METODY .....</b>	<b>- 28 -</b>
<b>3.5.3. WESTERN BLOT .....</b>	<b>- 30 -</b>
<b>4. DISKUZE .....</b>	<b>- 31 -</b>
<b>5. ZÁVĚR.....</b>	<b>- 33 -</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>- 34 -</b>
<b>7. SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>- 37 -</b>

# **1. CÍL PRÁCE**

Cílem mé bakalářské práce bylo nastítnit problematiku HIV a především diagnostické metody průkazu viru, jejich využití v praxi, pozitiva a negativa jednotlivých metod.

## 1.1. SOUHRN

V první části bakalářské práce je uvedena obecná charakteristika viru HIV. Na historický přehled navazuje obecná charakteristika (taxonomie, struktura). Dále jsou popsány možné cesty přenosu infekce, patogeneze, klasifikace. Onemocnění AIDS má dvě fáze - akutní a chronickou, které se vyznačují rozdílnými laboratorními výsledky a klinickými projevy. Jsou zde také stručně vyjmenovány dostupné antivirové preparáty.

Druhá část pojednává o diagnostických přístupech volených k detekci viru HIV - jde o metody přímé i nepřímé. Do přímého průkazu patří kultivace, metoda PCR a stanovení antigenu p24. Metodami nepřímého průkazu jsou stanovení HIV protilátek.

## 1.1. SUMMARY

There is a general characteristic of HIV virus in the first part of the bachelor's study. The general characteristic ( taxonomy, structure) comes after a historical overview. Furthermore, the possible ways of a transport of the infection, pathogenesis and a classification of HIV. AIDS disease has got two phases – acute and chronic with different laboratory.. There is a short list of the accessible antiviral pharmaceuticals, as well.

There are the diagnostic accesses to a detection of the HIV virus in the second part of the study. The methods are direct and indirect. The direct methods include cultivation, PCR and a detection of the antigen p24. The indirect method is a detection of the HIV antibodies.

## 1.2. ÚVOD

Masové rozšíření infekce HIV (Human Immunodeficiency Virus) od jeho objevu v roce 1981, je jednou z největších pandemií v moderních dějinách lidstva. I přes intenzivní výzkum nebyl dosud nalezen léčebný postup, který by vedl k úplnému vyléčení nakažených nebo nemocných osob.

Infekce HIV a nemoc AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome) s sebou přináší především socioekonomický problém. I přesto, že existují účinné léky, které dokáží částečně potlačit infekci a prodloužit tak lidský život.

Devadesát procent všech HIV pozitivních osob žije v nejchudších oblastech rozvojového světa a nemohou si potřebnou péči zajistit. Také v České republice každoročně přibývá HIV pozitivních pacientů i přes rozsáhlé preventivní akce.

O to důležitější zůstává v první řadě prevence šíření nákazy, ale také včasná diagnostika.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST A: HIV / AIDS

### 2.1. DEFINICE HIV/AIDS

Virus lidské imunodeficiency (Human Immunodeficiency Virus, HIV) infikuje primárně cílové lidské buňky ( helper T-lymfocyty, makrofágy a dendritické buňky) a vede k rozvratu imunitního systému. AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrom) je poslední a nejtěžší fází HIV infekce. Ten je charakterizován výskytem některého z indikativních onemocnění, mezi než patří určité oportunní infekce, některé nádory, kachexie a encefalopatie.

### 2.2. HISTORIE ONEMOCNĚNÍ

Na jaře roku 1981 popsal newyorský dermatolog Dr.Friedman-Kien u dvou mladých a do té doby zdravých homosexuálně orientovaných mužů pro tuto věkovou kategorii velmi vzácný kožní nádor, Kaposiho sarkom. V téže době v Los Angeles M.S.Gottlieb a kol. prokázali u pěti homosexuálně zaměřených mužů pneumocystovou pneumonii, kandidózu dutiny ústní a cytomegalovirovou infekci.Všem těmto nemocným byl společný hluboký rozvrat imunity neznámého původu. Epidemiologické a statistické zhodnocení situace vedlo k závěru, že nově popsané onemocnění, označované od roku 1982 jako AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome), je vyvoláno s největší pravděpodobností infekčním původcem.(Hájek et al., 2004).

Byl zahájen výzkum, který v roce 1983 vedl k průkazu a charakterizování původce AIDS. Virové agens bylo nejprve nazváno francouzskými vědci LAV (Lymphadenopathy Associated Virus). Americká skupina pojmenovala virus HTLV-III (Human T Leukemia Virus). Definitivně byl přejmenován na HIV-1 roku 1986 (Krejsek a Kopecký, 2004).



## 2.3. TAXONOMIE HIV

Baltimorská klasifikace virů řadí druhy HIV-1 a HIV-2 do skupiny VI. (ssRNA viry s reverzní transkriptázou), čeleď *Retroviridae* (retroviry), podčeleď *Orthoretrovirinae*, rod *Lentivirinae* (lentiviry).

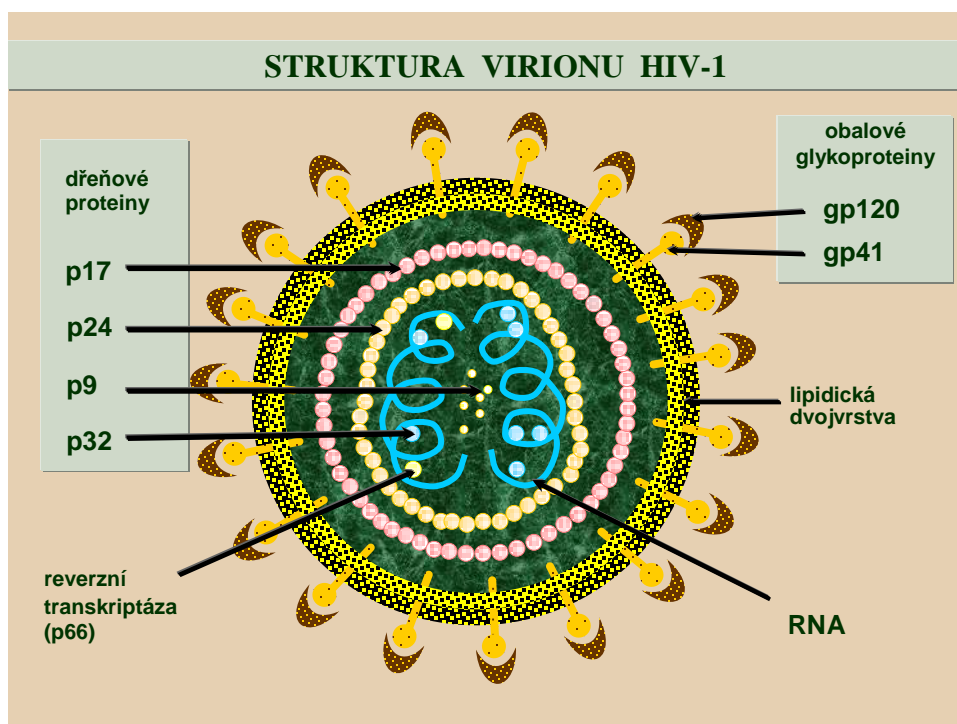
Pro retroviry je charakteristická přítomnost genomové jednovláknové RNA, která je přepisována pomocí RNA dependentní DNA polymerázy (reverzní transkriptázy) do dvoušroubovicové DNA. Pro podčeleď *Orthoretrovirinae* rod *Lentivirinae* (lentiviry) je typické, že infekce vede po dlouhé době latence k cytopatickému efektu a lýze buňky.

Na základě genetické analýzy se kmeny HIV-1 viru rozlišují do tří hlavních skupin: M, O a N. V rámci hlavní skupiny M se rozlišuje nejméně deset genetických podtypů označovaných jako klady A-J. Ve Spojených státech a v zemích západní Evropy převažuje subtyp B, zatímco v jiných částech světa dominují subtypy např. A, C, D a E.

Virus HIV-2 má většinu imunobiologických vlastností velmi podobných viru HIV-1. Největší výskyt viru HIV-2 je v západní Africe. Z genetického pohledu se odlišuje absencí genu *vpx* a přítomností genu *vpu*. Přestože je genetická organizace HIV-2 podobná viru HIV-1, je homologie mezi těmito viry na genetické i bílkovinné úrovni pouze 40% až 60%. Tato skutečnost komplikuje průkaz specifických protilátek (Krejsek a Kopecký, 2004).

## 2.4. STRUKTURA VIRIONU

Virová částice (Obr.č.1) má průměr 100-120 nm. V lipidovém obalu, pocházejícím z membrány hostitelské buňky, jsou výběžky složené ze dvou glykoproteinů (Gp). Gp41 tvoří část zakotvenou v membráně, na povrchu vyčnívající Gp120 je nástrojem adsorpce virionu na buněčné receptory. Pod obalem je membránový protein P17. Nukleoid ohraničený zevní kapsidou (p24) má asymetrický, kónický tvar. Dřeň nukleoidu obsahuje dvě identická vlákna RNA, která mají pozitivní (informační) polaritu, polypeptidy p7 a p9, které se váží na genom a tvoří vnitřní, helikoidální kapsidu a enzymy reverzní transkriptázu (RT), integrázu (IN) a virová proteáza (PR) (Bednář, et al. 1996).



Obr.č.1 Struktura virionu HIV-1 ([www.lfhk.cuni.cz/ukia/vyuka/aids.pps](http://www.lfhk.cuni.cz/ukia/vyuka/aids.pps))

## 2.5. PŘENOS INFEKCE

Virus lidského imunodeficitu (HIV) je velmi citlivým virem, který je rychle inaktivován a usmrcen prakticky všemi běžnými dezinfekčními prostředky. Mimo organismus virus velmi rychle umírá (Svoboda,1996).

HIV infekce se přenáší sexualně, parenterálně a vertikálně. Tyto způsoby přenosu jsou určeny přítomností viru v krvi, spermatu a vaginálním sekretu infikovaných osob. V podprahovém množství se virus vyskytuje i v dalších tělních tekutinách, jako slinách nebo slzách, ty se však v šíření viru neuplatňují.

- a) **Sexuální přenos** je hlavním způsobem přenosu. Může k němu dojít při vaginálním i análním sexuálním styku, ať už heterosexuálním nebo homosexuálním. Vstupní branou infekce je sliznice konečníku nebo pohlavního ústrojí. Riziko přenosu je vyšší ve směru muž-žena než ve směru žena-muž. Anální receptivní styk je spojen s nejvyšším rizikem.
  
- b) **K parenterálnímu přenosu** může dojít společným sdílením kontaminovaných injekčních jehel a stříkaček, obvykle u injekčních uživatelů drog. Teoreticky je možné nakazit se i tetovacím nebo nesterilními akupunkturními jehlami. K přenosu HIV infikovanými transfúzemi a krevními deriváty ( např. u hemofiliků) by v dnešní době nemělo docházet, protože všechny přípravky z krve podléhají povinnému testování ( v České republice od 1.června 1987) a zpracovávají se novými technologickými postupy. Protilátky se detekují za 3 týdny - 3 měsíce po infekci.Průkaz HIV virového antigenu p-24, předchází tvorbě protilátek 3-5 dnů. Nepatrné riziko je dáno asi 20denním „okénkem“ (Window Period – serologické okno) mezi expozicí a sérokonverzí. Nozokomiální infekce při dodržení elementárních zásad asepse nejsou prakticky možné. Nebyl prokázán přenos komáry nebo jiným bodavým hmyzem. Riziko nákazy infekcí HIV, se podle rozsáhlých studií při skutečně krvavém poranění pohybuje okolo 0,3%.

- c) **K vertikálnímu přenosu** dochází v průběhu gravidity a zejména během porodu, výjimečně se může uplatnit přenos kojením ( Rozsypal, 1998, Hájek et al.,2004).

## 2.6. PATOGENEZE HIV INFEKCE

Infekce buňky začíná vazbou viru pomocí gp 120 na CD4 antigen, což je specifický receptor v membráně Th lymfocytů, monocytů, makrofágů, dendritických a gliových buněk. Vnímavost buněk na cytopatický efekt HIV je úměrná koncentraci molekul CD4 na jejich povrchu, proto jsou nejvíce poškozovány Th lymfocyty. Makrofágy a monocyty nejsou destruovány, ale jsou dlouhodobým rezervoárem viru a zdrojem rozsevu infekce po napadeném organismu.

Průniku HIV do cílové CD4 buňky předchází oddělení glykoproteinových obalů (tzv. odpláštění) a do cytoplazmy pak proniká konická jaderná struktura, která kromě řady strukturálních proteinů obsahuje dva řetězce RNA, reverzní transkriptázu (RT), integrázu (I) a virovou proteázu (P). Pomocí RT dojde záhy k přepisu RNA na provirovou DNA, která je posléze integrázou zabudována do genomu hostitelské buňky. Tím končí tzv. preintegrační fáze replikačního cyklu.

Vznik DNA podle RNA templátu enzymem RT, vede k častým mutacím ve virovém genomu. Ve skutečnosti jsou pacienti s AIDS nosiči mnoha různých variant HIV, které jsou geneticky odlišné od původního viru, kterým se infikovali. To s sebou přináší velké problémy při léčbě této choroby.

Časná fáze infekce HIV je charakterizována okamžitou tvorbou velkého množství nových virových částic v napadených buňkách. To je umožněno právě zabudovanou provirovou DNA. V následujících krocích (transkripce a translace) dojde postupně k syntéze komponent a po jejich kompletaci k uvolnění nových HIV mimo napadenou buňku. Vlivem virové proteázy pak dojde k „maturaci“ – rozštěpení původně polyproteinového řetězce na jednotlivé aktivní peptidy. Zralé HIV jsou infekční a napadají další, do té doby intaktní CD4 buňky.

Již během prvních dnů po nákaze HIV dochází k latentní infekci paměťových CD4 T-lymfocytů, což umožňuje viru dlouhodobě přežívat v rezervoárových orgánech a tkáních lidského těla (Hájek et al., 2004, Alberts, 2005).

## 2.7. KLASIFIKACE INFEKCE HIV

Klasifikace infekce HIV dle CDC (Centrum pro kontrolu chorob v Atlantě), platná od 1.1.1993 (Tab.č.1a,b).

Kombinací 3 klinických a 3 laboratorních kategorií vzniká 9 skupin: A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2, C3. Osoby zařazené do skupin C1, C2 a C3 splňují kritéria AIDS. Pacient nemůže být po zlepšení stavu překlasifikován do nižší kategorie.

Klinická kategorie	Definující diagnózy
<b>A</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Asymptomatická HIV infekce</li><li>• Perzistující generalizovaná lymfadenopatie</li><li>• Akutní (primární) HIV infekce (rovněž v anamnéze)</li></ul>
<b>B</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Horečka &gt;38.5°C déle než měsíc</li><li>• Průjem déle než měsíc</li><li>• Orofaryngeální kandidóza</li><li>• Vulvovaginální kandidóza (chronická nebo obtížně léčitelná)</li><li>• Herpes zoster recidivující nebo postihující více dermatomů</li><li>• Orální "chlupatá" leukoplakie</li><li>• Lymfoidní intersticiální pneumonitida</li><li>• Cervikální dysplazie nebo carcinoma in situ</li><li>• Zánětlivá onemocnění malé pánve</li><li>• Listerióza</li><li>• Bacilární angiomatóza</li><li>• Trombocytopenická purpura</li><li>• Periferní neuropatie</li></ul>
<b>C</b> (AIDS)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Pneumocystová pneumonie</li><li>• Toxoplasmová encefalitida</li><li>• Ezofageální, tracheální, bronchiální nebo plicní kandidóza</li><li>• Chronický anální herpes simplex nebo herpetická bronchitida, pneumonie nebo ezofagitida</li><li>• CMV retinitida</li><li>• Generalizovaná CMV infekce (kromě jater, sleziny a lymfatických uzlin)</li></ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Progresivní multifokální leukoencefalopatie</li> <li>• Recidivující pneumonie (2 a více epizod za rok)</li> <li>• Recidivující salmonelová bakteriémie</li> <li>• Chronická intestinální kryptosporidióza (průjem &gt;1 měsíc)</li> <li>• Chronická intestinální izosporóza (průjem &gt;1 měsíc)</li> <li>• Extrapulmonální kryptokoková infekce</li> <li>• Diseminovaná nebo extrapulmonální histoplazmóza</li> <li>• Diseminovaná kokcidioidomykóza</li> <li>• Tuberkulóza</li> <li>• Diseminovaná nebo extrapulmonální mykobakteriíza</li> <li>• Kaposiho sarkom</li> <li>• Maligní lymfomy (Burkittův, imunoblastický)</li> <li>• Primární lymfom mozku</li> <li>• Invazivní karcinom děložního hrdla HIV encefalopatie</li> <li>• Wasting syndrom</li> </ul>
--	--

Tabulka č.1a Klasifikace HIV infekce podle CDC 1993 –klinické kategorie  
(Rozsypal,1998)

Laboratorní kategorie	Počet CD4+ lymfocytů	
	absolutní (/μl)	relativní (%)
<b>1</b>	>500	>28
<b>2</b>	200-500	14-28
<b>3</b>	<200	<14

Tabulka č.1b Klasifikace HIV podle CDC 1993 – laboratorní kategorie  
(Rozsypal,1998)

## 2.8. AKUTNÍ A CHRONICKÁ FÁZE INFEKCE HIV

Bezprostředně po infekci nastává krátké období akutní fáze, které se projevuje symptomy podobnými chřipce nebo může být i asymptomatické. V krvi pacienta je v té době velké množství virových částic a probíhá intenzivní imunitní odpověď (protilátková i cytotoxická). Přechodně poklesne počet CD4+ T-lymfocytů. Během několika týdnů se tento počet vrátí k normálním hodnotě, množství virových částic v krvi dramaticky klesne, vznikne velké množství anti-HIV protilátek a virově specifických klonů T-lymfocytů. Tento stav přetrvává v další, asymptomatické fázi onemocnění, které zpravidla trvá několik let.

V symptomatické fázi se začínají projevovat poruchy imunity, propukají různá infekční onemocnění. V této fázi začíná vzrůstat množství viru v krvi, klesat počet CD4+ T-lymfocytů a množství antivirových protilátek. Dysfunkce imunitního systému infikovaného virem HIV vede postupně k selhání většiny složek imunity se všemi důsledky, jako je snížená rezistence k infekcím, zvýšená incidence některých charakteristických nádorových chorob a různé projevy autoimunity a alergie. V konečné fázi (vlastní AIDS) počet CD4+ T-lymfocytů klesá téměř k nule a postižení umírají nejčastěji na oportunní infekce (Hořejší a Bartůňková, 2005).



## 2.9. SOUČASNÁ LÉČBA HIV INFEKCE

Současná éra HAART (Highly Aktive Antiretroviral Therapy) „vysoce aktivní antiretroviróvá terapie“, je spojena se zlepšením kvality života HIV infikovaných, jejich dlouhodobějším přežíváním vzhledem k redukci úmrtí na terminální stadia AIDS. Zároveň však základními problémy zůstávají jednak vysoký výskyt nežádoucích účinků a také častý vznik rezistence, v neposlední řadě ovšem také vysoká ekonomická náročnost.

### **Virostatika užívaná k léčbě:**

- Nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (NRTI)  
-Zidovudin, Lamivudin, Stavudin, Didanosin a Abacavir
- Nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (NNRTI)  
-Nevirapin, Efavirenz.
- Inhibitory proteáz (PI)  
\_\_\_-Ritonavir, Lopinavir.
- Inhibitory fúze (FI)  
\_\_\_-Enfuvirtid

Terapie by měla respektovat zásady HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) – doporučována je kombinace nejméně tří preparátů z alespoň dvou léčebných skupin, čímž se minimalizuje vznik rezistence. Princip léčby spočívá v blokování různých míst replikačního cyklu HIV. Cílem by měla být dlouhodobá kontinuální inhibice replikace HIV v cílových CD4+ T lymfocytech. Následně klesá i virémie (tzv. virová zátěž, z angl. Viral Load - VL). Nepřítomnost destruktivního vlivu HIV na cílové CD4+ buňky vede k jejich

postupné obnově. Tím se také postupně zvyšuje imunologická kompetence HIV-pozitivních osob. Správně zvolená léčba vede v poměrně krátké době (do 3 měsíců) k významnému poklesu VL a zvýšení absolutních i relativních počtů periferních CD4+ t-lymfocytů.

V roce 2007 byly pro klinickou praxi uvolněny první zástupci dalších dvou skupin léků – jednak inhibitor koreceptoru CCR5 maraviroc, který blokuje proces přichycení HIV na cílové buňce a také první inhibitor HIV integrázy raltegravir, který blokuje proces integrace provirové DNA do genomu napadené buňky. Oba tyto přípravky nejsou v České republice dosud k dispozici, lze ale očekávat, že v průběhu roku 2008 jimi budou léčeni první pacienti (Machala, 2008; Sedláček et al., 2007).

Jak vyplývá z výše uvedeného, jedinou možností jak zabránit pandemii infekce HIV-1 a AIDS je aktivní imunizace. Z požadavků, které jsou na aktivní imunizaci kladeny vyplývá, že vakcína by měla vzbudit dostatečnou protektivní imunitu, která by měla být dlouhodobá. Vakcína by měla působit na všechny genotypy viru HIV-1 a měla by odrážet rychlou proměnlivost jednotlivých kmenů viru HIV-1. V neposlední řadě by měla být dostupná pro všechny ohrožené skupiny. Dosud není taková vakcína k dispozici, i přes značné úsilí, které bylo jejímu vývoji věnováno (Krejsek a Kopecký, 2004).

## 2.9.1. POSTEXPOZIČNÍ PROFYLAXE

Postexpoziční profylaxe (PEP) slouží k zábraně přenosu HIV infekce u exponovaných osob ve vysokém riziku, jako je perkutánní poranění kontaminovaným předmětem nebo pohlavní styk. Léky se podávají po dobu 4 týdnů a podle míry rizika přenosu infekce se volí buď kombinace dvou NRTI nebo při vysokém riziku kompletní HAART. Maximální účinnost má profylaxe při nasazení během 1-2 hodin, respektive 24 hodin po expozici. Po uplynutí více než 72 hodin od expozice je již profylaxe považována za neúčinnou. Při správně prováděné profylaxi lze počítat se snížením rizika o přibližně 90-95% (Machala, 2006).

## 3. TEORETICKÁ ČÁST B: HIV / AIDS

### 3.1. DIAGNOSTIKA HIV INFEKCE

Krátce po objevu HIV, byly vypracovány a v roce 1985 do komerčního využití přivedeny laboratorní testy pro detekci infekce virem HIV. Jednalo se o enzymové imunoeseje typu ELISA pro detekci protilátek proti viru HIV. Do tehdejšího Československa byly první testy na detekci HIV protilátek na naléhání odborníků dovezeny začátkem roku 1986 (Brůčková, 2001).

V současné době patří mezi rutinní metody vyšetření HIV/AIDS nepřímé stanovení protilátek HIV-1/2 společně s antigenem p24 metodou ELISA (Enzyme Liked Immunosorbent Assay) nebo MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay).

Každý reaktivní výsledek je nutno ověřit specifičtější metodou (např. Western blot). Konfirmaci reaktivních vzorků zajišťuje v České republice Státní zdravotnický ústav (SZÚ), Národní referenční laboratoř pro AIDS, se sídlem Šrobárova 48 Praha 10.

### 3.2. MATERIÁL

Při odběrech biologického materiálu vždy použijeme rukavice, k odběrům krve použijeme uzavřený systém (např. Vacutainer firmy Becton Dickinson, dodavatel pro ČR-Ars Audio), používáme jen jednorázové odběrové pomůcky. Všechny tyto zásady bezpečnosti práce s biologickým materiálem vedou k minimalizaci rizika infekce pro zdravotnický personál.

Žilní krev se odebírá v množství 5-7 ml a následně je provedena centrifugace. Získané sérum (případně plazma) je možné uchovávat při 4°C až 48 hodin.

Další tělní tekutiny používané pro detekci protilátek nebo virového antigenu jsou: mozkomíšní mok, sliny, sperma, vaginální sekret nebo bioptické vzorky různých tkání.

### 3.3. PŘÍMÝ PRŮKAZ

Tyto metody jsou založeny na přímém průkazu přítomnosti některé virové komponenty ve vzorku pacienta.

Tento druh diagnostiky se používá především pro diagnostiku vertikální infekce u dětí v prvním půlroce věku a diagnostiku akutní HIV infekce. V neposlední řadě se používá i pro sledování průběhu infekce, kdy je možné zjistit počet infikovaných buněk na 1 ml krve.

#### **A) KULTIVACE HIV**

Přímý průkaz viru kultivací *in vitro* je v případě viru HIV obtížným, zdlouhavým a pro laboratorní pracovníky z hlediska možnosti profesionální nákazy nebezpečným procesem. Izolace viru se provádí technikou kokultivace mononukleárních buněk ( T-lymfocytů) periférní krve s buňkami zdravých dárců (nejvhodnější je pupečnicková krev). Virus HIV se v těchto buněčných kulturách projevuje tvorbou cytopatického efektu, eventuálně tvorbou syncytií ( Brůčková, 2000).

V dnešní době se tato metoda standartně pro průkaz nepoužívá, spíše nachází užití pro vědecký výzkum.

#### **B) PRŮKAZ GENETICKÉ INFORMACE HIV**

HIV virové nukleové kyseliny se detekují buď v buňkách (provirová DNA), nebo v plazmě (virová RNA). K průkazu HIV virové RNA s pomocí molekulárně biologických testů, zejména polymerázové řetězové reakce (PCR) je možno v plazmě detekovat virus již za 10-12 dnů po infekci. Protože HIV je RNA virus, musí být použita technika reverzně-transkriptázová PCR (RT-PCR). Virová RNA je nejprve přepsána reverzní transkriptázou na dvojšroubovicovou DNA, která je v následném kroku amplifikována PCR reakcí.

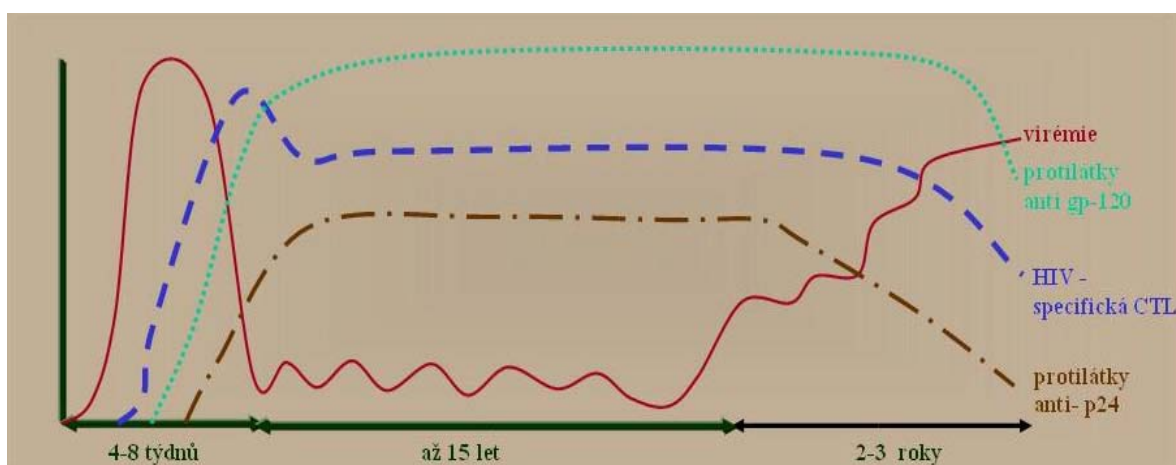
Izolace HIV virových nukleových kyselin se používá u vyšetření novorozenců a kojenců HIV-pozitivních matek, ke sledování progresu infekce, při hodnocení účinku léčby a z likvoru při podezření na progresi infekce HIV v CNS. (Brůčková, 2000, Zima et al. 2008).

### **C) PRŮKAZ HIV ANTIGENU p24**

Detekce HIV antigenu p24 je dalším ze serologických testů laboratorní diagnostiky HIV/AIDS. V praxi je nejvíce využívána metoda EIA (enzymoimunoanalýza). Bylo prokázáno, že v různých fázích infekce lze v periférní krvi prokázat vnitřní (corové) struktury viru HIV proteinové povahy. Tyto antigenní částice lze v krevním séru detekovat především ve stádiu akutní infekce krátce po vniknutí viru do organismu. Poměrně záhy, udává se, že průměrně do 3 měsíců, klesá jejich výskyt k neměřitelným hodnotám. Znovu se antigen p24 objevuje s nastupujícími klinickými příznaky plně rozvinutého onemocnění AIDS, tedy ve finálním stádiu infekce. Protože výskyt antigenu o několik dnů předchází výskytu protilátek (udává se o 5-6 dnů), lze testováním antigenu o tento interval zkrátit tzv. imunologické okno (Brůčková, 2000).

### 3.4. NEPŘÍMÝ PRŮKAZ

Zaměřuje se na průkaz specifických protilátek HIV, které se objevují přibližně po prvním až třetím měsíci po expozici. Diagnostika těchto protilátek (Obr.č.2) slouží jako základ pro určení diagnózy HIV infekce. Tuto metodu využívají například testy ELISA a dále testy western blot. Ty jsou více technicky náročné, ale i vysoce specifické. Testy western blot slouží zejména jako ověřovací testy pro reaktivní testy ELISA.



Obr.č.2 Dynamika specifických protilátek HIV

([www.lfhk.cuni.cz/ukia/vyuka/aids.pps](http://www.lfhk.cuni.cz/ukia/vyuka/aids.pps))

**virémie** – přítomnost viru v krvi

**protilátky anti gp-120** – protilátky proti obalovému glykoproteidu gp-120

**HIV-specifická CTL** – HIV specifické T-lymfocyty

**protilátky anti-p24** – protilátky proti dřevému proteinu p24

## **A) PRŮKAZ SPECIFICKÝCH PROTILÁTEK**

Průkaz specifických protilátek proti viru HIV je nejrozšířenějším používaným nástrojem diagnostiky infekce HIV a onemocnění AIDS. Protilátky se detekují za 3 týdny – 3 měsíce po infekci v séru nebo v plazmě. Protilátky proti povrchovým antigenům (gp41, gp120) přetrvávají v organismu po celý život. Detekce HIV protilátek se používá nejen k účelům diagnostickým, ale i v prevenci šíření infekce (např. k testování krevních dárců, krevních přípravků a gravidních žen).

V transfuzní službě se HIV pravidelně testuje od r. 1987. Od počátku testování jsou vyšetřovány HIV protilátky technikou ELISA, výběr testů schválila Národní referenční laboratoř (NRL). A tento princip se uplatňuje dodnes (Turek, 2005).

Laboratorní testy pro průkaz HIV protilátek jsou vesměs založeny na principu enzymových imunoesejí (EIA) typu ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

Mezi běžně používané komerční testy patří např. Vironostika HIV Uni-form II Ag/Ab od firmy Biomérieux. Tento vyšetřovací systém je používán pro automatický ELISA systém DSX, firmy Dynex Technologies s.r.o. (Obr.č.3).





Obr.č.3 Automatický ELISA systém DSX (Snímek pořízen fotoaparátem Canon Power Shot S 3 IS)

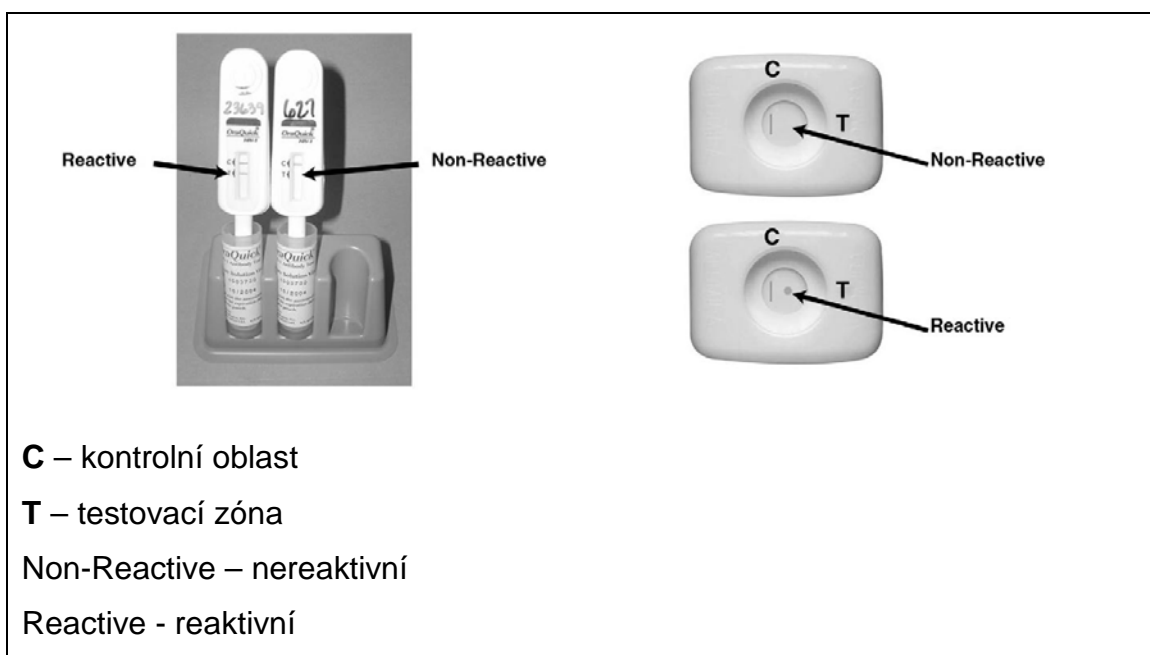
### **B)Průkaz specifických protilátek rychlými HIV testy**

Podobně jako konvenční EIA, jsou rychlé HIV testy screeningové. Jsou-li prováděny správně, detekují HIV protilátky s citlivostí podobnou s v současnosti dostupnými EIA testy. Jsou určeny pro použití tam, kde nejsou k dispozici potřebné podmínky nebo vybavení (v rozvojových zemích, v centrech pro drogově závislé) k vyšetření standardních EIA testů.

Všechny komerčně dostupné rychlé HIV testy jsou interpretovány vizuálně a nevyžadují žádné vybavení. HIV antigeny jsou připevněny k testovacím proužkům nebo membráně. Pokud jsou HIV protilátky přítomné v testovacím vzorku, naváží se na připevněný antigen. Kolorimetrické činidlo přítomné v kitu se váže na tyto imunoglobuliny a vytvoří ukazatel, který je vizuálně zjizitelný.

OraQuick testovací zařízení (Obr.č.4) ve tvaru pádla obsahuje pásek z nitrocelulózy, k němuž je v testovací „T“ oblasti přichycen proužek se syntetickými peptidy gp41 zastupující HIV-1 a gp36 HIV-2, proužek s kozím

antihumánním IgG v kontrolní „C“ oblasti. Vzorek (plná krev, plazma, serum, sliny) je přidán přímo do vyvíjecí lahvičky. Pokud jsou HIV protilátky ve vzorku přítomny, váží se na peptidy způsobující červenou linii, která se objeví v testovací oblasti. Jak roztok putuje dále, dorazí k antihumánní IgG kontrole a byl-li přidán adekvátní vzorek, tak se zobrazí červená linie v kontrolní oblasti. Všechny „předběžně reaktivní“ vzorky vyžadují potvrzení výsledku více specifickými testy např. Western blot (Greenwald et al.,2006).



Obr.č.4 Rychlé testy OraQuick Advance Rapid HIV-1/2 (Greenwald et.al., 2006)

## 3.5. PRINCIPY METOD

### 3.5.1. PCR

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction) je molekulárně biologická metoda. Principem je enzymatická amplifikace DNA in vitro syntézou mnoha kopií vybrané sekvence DNA v cyklické reakci o třech teplotních fázích. Protože HIV je RNA virus, musí být použita technika RT-PCR (Reverzně-transkriptázová PCR). Tato technika dovoluje detekci a v určitých případech i kvantifikaci množství mRNA pro určitý gen. Při reverzně-transkriptázové PCR je mRNA nejprve přepsána do cDNA pomocí některé z reverzních transkriptáz. Reverzní transkriptáza je po skončení syntézy prvního vlákna cDNA inaktivována a úseky DNA, které chceme analyzovat, jsou dále namnoženy pomocí klasické PCR

Výhodou PCR je, že lze vyšetřovat takřka jakýkoliv typ materiálu, vysoká specifita a citlivost. Nevýhodou je, že tato metoda vyžaduje drahé chemikálie, kvalifikované pracovníky a pečlivé dodržování laboratorních protokolů (Votava et al.,2000).

Samotná PCR diagnostika není dostačující v některých (latentních) fázích HIV infekce, kdy je přítomnost infekčního viru v plazmě, detekována jako HIV RNA, prakticky neměřitelná. Virus se sice intenzivně v organismu replikuje v mízních uzlinách, do periférní krve se však neuvolňuje (Brůčková,2001).

### 3.5.2. EIA METODY

EIA (enzymoimunoanalýza), patří mezi metody, které zaznamenaly velký zvrat v laboratorní diagnostice a pro svoji citlivost umožnily stanovení i malých koncentrací látek. Jejich podstatou je reakce antigen-protilátka. EIA metody, které pomocí imunochemické reakce s enzymatickou detekcí umožňují stanovit v neznámém vzorku koncentraci antigenu nebo protilátky. Důležité je to, že indikátorem imunoanalytické metody je enzymový konjugát. Podle povahy substrátu je reakci možno detekovat spektrofotometricky, nefelometricky, fluorometricky a luminometricky (Bartůňková a Paulík, 2005).

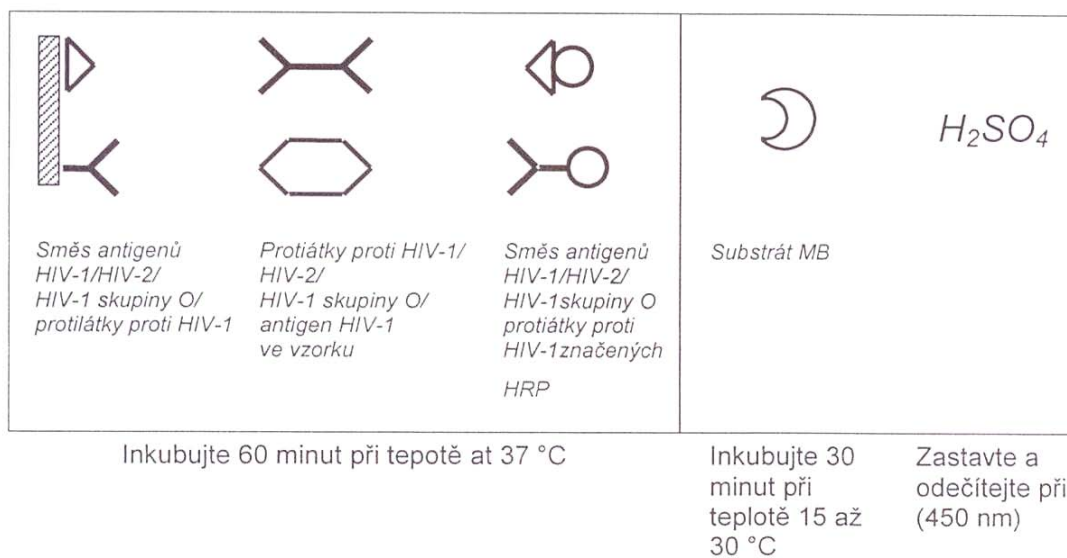
ELISA (Enzyme Linked. Immunosorbent Assay) je speciálním druhem EIA (enzymoimunoanalýza). Touto metodou lze vyšetřovat antigeny HIV (nejčastěji p24 antigen) nebo protilátky proti HIV-1 a HIV-2 v séru nebo plazmě pacientů s podezřením na infekci HIV (Obr.č.5).

V průběhu let byly vyvinuty čtyři generace komerčních testů metody EIA. Lze jimi detekovat protilátky třídy IgG, IgM a čtvrtou generací lze detekovat virovou kapsidu p24. První generace testů obsahovala virový lyzát, druhá generace rekombinantní protein s HIV kapsidou. Testy třetí a čtvrté generace jsou používány v současné době (Marquez et al, 2008).

Princip metody spočívá v tom, že protilátka nebo antigen jsou navázány na pevnou fázi (např. stěnu jamky) a po kompetitivní reakci s antigenem nebo protilátkou se ve vzorku ustává rovnováha. Nenavázaný konjugát (druhá protilátka značená enzymem) je odstraněn z reakční směsi promytím a konjugát vázaný na pevné fázi je inkubován s enzymovým substrátem, provádějí barevnou reakci a následně změřen fotometricky.

Výhodou těchto testů je jejich vysoká citlivost, specificita, reprodukovatelnost, možnost masového provádění s použitím částečné či plné automatizace a objektivní přístrojové hodnocení výsledků. Nevýhodou jsou časté falešně pozitivní reakce (např. častěji v třetím trimestru gravidity, za

přítomnosti revmatoidních faktorů a při různých dysimunoglobulinémiích)  
(Svoboda,1996, Bartůňková et al, 2005).



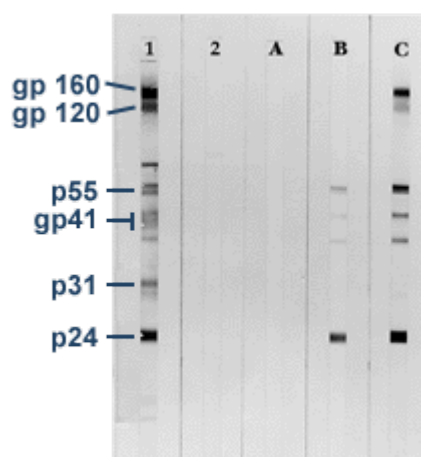
Obr.č.5. Průběh ELISA testu (příbalový leták vyšetřovacího setu Vironostika HIV Uni-Form II Ag/Ab, výrobce BioMérieux bv)

### 3.5.3. WESTERN BLOT

Western blot (WB) je technika na bázi elektroforézy, imunochemie a enzymatické reakce.

V průkazu HIV infekce jsou touto metodou nejčastěji detekovány protilátky se specifickou proti proteinu, core antigenu p24, p17, p55, p40, a rozhodující protilátky proti glykoproteinovým antigenům obalu viru (gp160, gp120, gp41). Nejprve dojde pomocí elektroforézy k jejich frakcionaci podle hmotnosti a poté jsou proteiny převedeny na nitrocelulósovou membránu. Následuje vizualizace pomocí vazby se specifickými protilátkami, které jsou značeny např. enzymem. Možné způsoby detekce jsou: kolorimetrická, chemiluminiscenční, radioaktivní a fluorescentní. (Obr.č.6). Pokud jsou přítomny alespoň dva ze tří antigenů (p24, gp41, a nebo gp120, gp160), je výsledek testu pozitivní. Pokud je přítomna nějaká jiná kombinace antigenů, pak je výsledek neurčitý.

Oproti běžným sérologickým metodám jako je ELISA, je WB sice časově náročnější a dražší, ale za to přesnější. Na rozdíl od ELISY, která kvalitativně detekuje protilátky bez rozlišení specifických antigenů. WB je pravděpodobně nejvíce využívaným konfirmačním testem (Zetola a Klausner, 2006).



- 1) Pozitivní kontrola HIV-1.
- 2) Negativní kontrola.
- 3) WB pacienta A (negativní výsledek)
- 4) WB pacienta B (nejasný výsledek)
- 5) WB pacienta C (pozitivní výsledek)

Obr.č.6 Western blot ([www.biology.arizona.edu](http://www.biology.arizona.edu))

## 4. DISKUZE

Vir HIV a nemoc AIDS jsou v současné době označovány za pandémii 3. tisíciletí. Tento malý a velmi náchylný vir způsobil řadu pokrokových změn v oborech jako jsou mikrobiologie, imunologie, molekulární biologie aj..

V boji s tímto proměnlivým virem nám pomáhá řada neustále se vyvíjejících diagnostických metod. Ihned po objevu viru bylo vyvíjeno značné úsilí najít metodu, která by prokázala přítomnost viru v organismu ještě před nástupem klinických projevů onemocnění AIDS.

V současné době již existují takové testy, které jsou schopny detekovat infekci již po 3 týdnech od možné nákazy. Rychlé HIV protilátkové testy započínají revoluci v testování pacienta mimo zdravotnické zařízení. Tím přispívají k lepší dostupnosti a následně pomáhají překonat překážky k včasné diagnóze a mohou tak zlepšit návaznost v péči o infikovanou osobu. Rychlé HIV protilátkové testy společně s EIA metodami jsou metody screeningové. EIA i rychlé HIV testy jsou značně citlivé a proto se u nich častěji setkáme s tzv. falešnou reaktivitou. Rychlé HIV protilátkové testy mají oproti EIA metodám výhody – rychlost, dostupnost, nenáročnost na obsluhu a technické vybavení. Cenové relace jsou u těchto testů téměř totožné. V České republice však stále převládá vyšetřování v klinických laboratořích.

Metoda Western blot je vysoce specifická, drahá a časově náročná. Vyšetření je prováděno převážně manuálně s vyššími nároky pro laboratorní personál, a proto je WB využíván převážně specializovanými pracovišti jako konfirmační metoda.

Další vysoce specifická a citlivá metoda PCR je v současnosti již více využívána i pro běžnou praxi jako screeningové vyšetření. Zejména se využívá k průkazu infekce u novorozenců HIV - pozitivních matek, kdy nelze použít vyšetření protilátkových testů. Tato metoda má však na rozdíl od protilátkových testů nevýhody – je dražší, vyžaduje náročné technické vybavení a kvalifikovaný laboratorní personál.

Pro bezpečnost krevních přípravků, transplantovaných orgánů a včasnou detekci u těhotných matek by bylo ideální používat kombinaci vyšetření protilátkových testů, testů na přítomnost antigenu p24 a testů pro průkaz virové RNA (PCR).

Kultivace viru není v současnosti běžně používána pro průkaz infekce HIV. Metoda je velmi drahá, náročná a představuje zvýšené riziko laboratorní nákazy. Bývá využívána pro vědecký výzkum.



## 5. ZÁVĚR

Z uvedených údajů vyplývá, že včasným záchytem HIV pozitivních osob a jejich poučením lze napomoci k zpomalení šíření infekce HIV/AIDS.

Díky tomuto viru došlo během posledních dvaceti let k rozsáhlému výzkumu v oboru imunologie. Bylo zapotřebí vyvinout rychlé, finančně dostupné a citlivé metody detekce. Aby bylo možné testovat co nejvíce vzorků pohromadě pro potřeby transfúzních stanic, v prenatální diagnostice aj.. Tuto podmínku v dnešní době splňují metody ELISA a PCR, které lze i plně zautomatizovat.

V současné době jsou na trhu i rychlé screeningové HIV testy, které našly uplatnění v klinických i neklinických zařízeních. Zejména pak v rozvojových zemích a v centrech pro drogově závislé.

Metoda Western blot je ponechána jen na speciálních pracovištích a je považována za metodu referenční.

V problematice HIV/AIDS zůstává nadále nejdůležitější prevence, jako způsob ochrany před tímto onemocněním. Intenzivně se pracuje na účinné vakcinaci, ale komplikovanost tohoto viru brání rychlejšímu rozvoji.

## 6. LITERATURA

1. ALBERTS, B. *Základy buněčné biologie*. Ústí nad Labem : Espero, [2005]. 630 s. ISBN 80-902906-2-0
2. BARTŮŇKOVÁ, J., PAULÍK, M., et al. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Praha : Grada, 2005. 176 s. ISBN 80-247-0691-1
3. BEDNÁŘ, M., et al. *Lékařská mikrobiologie*. Praha : Marvil, 1996. 558 s.
4. *The Biology Project* [online]. © 2001-2004 [cit. 2008-04-12]. Dostupné z: <<http://www.biology.arizona.edu>>.
5. BRŮČKOVÁ, M. Detekce infekce HIV u dárců krve. *Transfuze a dnes*, 2001, roč. 7, č. 1, s. 15-18. ISSN 1212-9887.
6. BRŮČKOVÁ, M. Laboratorní diagnostika HIV/AIDS. *Praktický lékař*, 2000, roč. 80, č. 8, s. 430-434. ISSN 0032-6739.
7. GREENWALD, J. L., et al. A rapid review of rapid HIV antibody tests. *Current infectious disease reports*, Mar 2006, vol. 8, iss. 2, p. 125–131. ISSN 1523-3847
8. HÁJEK, M., et al. *HIV/AIDS v chirurgických oborech*. Praha : Grada, 2004. 79 s. ISBN 80-247-0857-4.
9. HOŘEJŠÍ, V., BARTŮŇKOVÁ, J. *Základy imunologie*. Praha : Triton, 2005. 279 s. ISBN 80-7254-686-4.
10. HULÍNSKÁ, D., VOTÝPKA, J. Jeden z technických problémů diagnostiky pomocí polymerázové řetězové reakce. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, 2004, roč. 10, č. 3, s. 138-140. ISSN 1211-264X.

11. *Imunobiologie infekce HIV a AIDS : přednáška* [online]. Hradec Králové : Ústav klinické imunologie a alergologie. Aktualizováno 2008-02-29. [cit. 2008-04-12]. Dostupné z: <[www.lfhk.cuni.cz/ukia/vyuka/aids.pps](http://www.lfhk.cuni.cz/ukia/vyuka/aids.pps)>.
12. KREJSEK, J., KOPECKÝ, O. *Klinická imunologie*. Hradec Králové : Nucleus HK, 2004. 941 s. ISBN 80-86225-50-X.
13. MACHALA, L. Postexpoziční profylaxe přenosu HIV. *Lékařské listy : prevence - diagnostika - terapie - péče - teorie - praxe*, 2006, roč. 55, č. 15, s. 7-8. ISSN 0044-1996.
14. MACHALA, L., JILICH, D. Současné možnosti a problémy antiretrovirové terapie. *Praktický lékař*, 2008, roč. 88, č. 2, s. 71-77. ISSN 0032-6739.
15. MARQUEZ, C., ZETOLA, N., KLAUSNER, J. D. HIV testing : an update. *Medical Laboratory Observer*, Feb 2008, vol. 40, iss. 2, p. 12-21. ISSN 05807247. Dostupné z: <<http://proquest.umi.com/>>.
16. ROZSYPAL, H. *AIDS : klinický obraz a léčba*. Praha : Maxdorf, 1998. 236 s. ISBN 80-85800-92-6
17. SEDLÁČEK, D., et al. Komplexní postup antiretrovirové léčby osob infikovaných virem lidské imunodeficiencie (HIV) v České republice. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, 2007, roč. 13, č. 1, s. 28-34. ISSN 1211-264X.
18. SVOBODA, J. *Imunologie v klinické praxi. Sv. 1, HIV onemocnění a AIDS jako modely postižení imunitního systému*. Praha : Marvil, 1996. 435 s.
19. TUREK, P. Vyšetřování infekce HIV u dárců krve v ČR. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie*, 2006, roč. 15, č. 1, s. 37-39. ISSN 1211-7358.

20. VOTAVA, M., et al. Polymerázová řetězová reakce v mikrobiologické diagnostice. *Praktický lékař*, 2000, roč. 80, č.11, s. 632-634. ISSN 0032-6739.
21. ZETOLA, N., KLAUSNER, J. D. HIV testing : an update. *Medical Laboratory Observer*, Sep 2006, vol. 38, iss. 9, p. 58-62. ISSN 05807247. Dostupné z: < <http://proquest.umi.com/>>.
22. ZIMA, T., et al. *Laboratorní diagnostika*. Praha : Galén, 2007. 728 s. ISBN 978-80-7262-372-3.

## 7. SEZNAM ZKRATEK

**AIDS** - Acquired Immune Deficiency Syndrome, syndrom získaného selhání imunity

**CD4** - subpopulace lymfocytů T (T-lymfocytů)

**CDC** - Centers for disease control and prevention ( Centra pro kontrolu nemocí a prevenci)

**EIA** - enzymoimunoanalýza

**ELISA** - Enzyme linked immunosorbent assay

**FI** - inhibitor fuze

**Gp** - glykoprotein

**HAART** - Highly Aktive Antiretroviral Therapy (současný standart antiretrovirové kombinační léčby)

**HIV** - Human Immunodeficiency Virus, virus selhání lidského imunitního systému

**IN** – virová integráza

**MEIA** – Microparticle Enzyme Immunoassay, enzymová imunoanalýza na mikročásticích

**NNRTI** – nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy

**NRL AIDS** – Národní referenční laboratoř pro AIDS v SZÚ Praha

**NRTI** – nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy

**PCR** – polymerázová řetězová reakce

**PEP** – postexpoziční profylaxe

**PGL** – perzistující generalizovaná lymfadenopatie

**PI** – inhibitory virové proteinázy

**PR** – virová proteáza

**RT** – reverzní transkriptáza

**SZÚ** – státní zdravotnický ústav

**VL** – „viral load“ (virová nálož)-HIV RNA, prokazatelná po PCR

**WB** – western blot – konfirmační test