

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Vyšetření krve na infekční nemoci pro transfuzní lékařství
Legislativa různých zemí světa

(diplomová práce)

Vedoucí katedry: PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Školitel diplomové práce: Mgr. Klára Konečná

Školitel – specialista diplomové práce: MUDr. Martin Šumpík

Vypracovala: Bc. Eva Dohnalová

Hradec Králové
2010

„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 diplomové práce. Zejména bych chtěla poděkovat Mgr. Kláře Konečné, MUDr. Martinu Šumpíkovi a celé své rodině za podporu a pomoc.

OBSAH:

ABSTRAKT	6
ABSTRACT	7
SEZNAM ZKRATEK	8
1. CÍL PRÁCE	11
1.1. SOUHRN	12
1.1. SUMMARY	13
1.2. ÚVOD	14
2. TEORETICKÁ ČÁST A	15
2.1. Virus lidské imunodeficiency	15
2.1.1. Historie	15
2.1.2. Taxonomie	16
2.1.3. Přenos infekce	17
2.1.4. Struktura	17
2.1.5. Diagnostika	19
2.2. Virus hepatitidy typu B	21
2.2.1. Historie	21
2.2.2. Taxonomie	21
2.2.3. Struktura	22
2.2.4. Přenos	23
2.2.5. Diagnostika	24
2.3. Virus hepatitidy typu C	27
2.3.1. Historie	27
2.3.2. Taxonomie	27
2.3.3. Struktura	28
2.3.4. Přenos	30
2.3.5. Diagnostika	30
2.4. T-lymfotropní virus 1/2	33
2.4.1. Historie	33
2.4.2. Taxonomie	34
2.4.3. Struktura	34
2.4.4. Přenos	36
2.4.5. Diagnostika	36

2.5. Virus západonilské horečky.....	38
2.5.1. Historie	38
2.5.2. Taxonomie	38
2.5.3. Struktura	39
2.5.4. Přenos	40
2.5.4. Diagnostika.....	40
2.6. Bakterie <i>Treponema pallidum</i>	41
2.6.1 Historie	41
2.6.2 Taxonomie	41
2.6.3 Struktura	41
2.6.4. Přenos	42
2.6.5. Diagnostika.....	43
2.7. Prvok <i>Trypanosoma cruzi</i>	44
2.7.1. Historie	44
2.7.2. Taxonomie	44
2.7.3. Struktura	44
2.7.4. Přenos	45
2.7.5. Diagnostika.....	45
4. TEORETICKÁ ČÁST B: Legislativa	47
4.1. Legislativa Evropské unie	47
4.2. Legislativa České republiky	48
4.3. Legislativa Slovenské republiky.....	49
4.4. Legislativa Polské republiky	49
4.5. Legislativa Rakouské republiky	50
4.6. Legislativa Německé republiky	50
4.7. Legislativa Spojeného království Velké Británie a Severního Irska.....	51
4.8. Legislativa Francouzské republiky.....	51
4.9. Legislativa Spojených států amerických	52
5. Diskuze	53
6. Závěr.....	55
7. Literatura	56

ABSTRAKT

Autor: Bc. Eva Dohnalová

Název práce: Vyšetření krve na infekční nemoci pro transfuzní lékařství
Legislativa různých zemí světa

Školitel-specialista: MUDr. Martin Šumpík

Garant diplomové práce: Mgr. Klára Konečná

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biologických a lékařských věd

Studijní obor: Odborný pracovník v laboratorních metodách

V první části diplomové práce je uveden přehled nejčastěji prokazovaných infekčních agens v transfuzní službě. U jednotlivých prokazovaných původců infekčních onemocnění je popsána historie, taxonomie, struktura, možnosti přenosu a nejčastěji volená diagnostika.

V druhé části diplomové práce je popsána jedna z oblastí legislativy transfuzního lékařství - vyšetření krve a krevních derivátů na infekční nemoci. Je zde uvedena legislativa některých států Evropské unie (Česká republika, Slovenská republika, Polsko, Německo, Rakousko, Spojené království Velké Británie a Severního Irska a Francie) a Spojených států amerických a jejich vzájemné porovnání.

ABSTRACT

Author: Bc. Eva Dohnalová

Title: Blood-bank testing for infectious diseases
Legislation of different countries of the world

Supervisor-specialist: MUDr. Martin Šumpík

Supervisor: Mgr. Klára Konečná

Diploma thesis

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Study specialisation: Specialist in Laboratory Methods

A list of most frequently detected infectious agents in blood transfusion service is presented in the first part of this thesis. The history, taxonomy, structure, possible ways of transmission and the most frequently selected diagnostics of detected causative agents are also described in this thesis.

In the second part of the thesis, there is described one of the areas of transfusion medicine legislation - blood and blood products testing for infectious diseases. The legislation of some countries of the European Union (the Czech Republic, the Slovak Republic, Poland, Germany, Austria, the United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland and France) and the United States of America and their mutual comparison is presented here as well.

SEZNAM ZKRATEK

AIDS - Acquired Immune Deficiency Syndrome, syndrom získaného selhání imunity

anti-HBc – anti Hepatitis B core, protilátky proti jadernému antigenu hepatitidy typu B

anti HBe – anti Hepatitis B envelope, protilátky proti antigenu obalu hepatitidy typu B

anti-HBs – anti Hepatitis B surface, protilátky proti antigenu povrchu hepatitidy typu B

ATL - adult T-cell leukemia , T-buněčná leukémie dospělých

CDC - Centers for Disease Control and Prevention, Centra pro kontrolu a prevenci nemocí

CMV - cytomegalovirus

CRF - circulating recombinant forms, cirkulující rekombinantní formy

DNA - deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina

dsDNA - double stranded deoxyribonucleic acid, dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina

EIA - enzyme immunoassay, enzymoimunoanalýza

ELISA - enzyme linked immunosorbent assay

EU - European Union, Evropská unie

FTA-ABS - Fluorescent Treponemal Antibody Absorption Test, test na průkaz onemocnění syfilis

Gp – glycoprotein, glykoprotein

HBcAg - Hepatitis B core Antigen, jaderný antigen viru hepatitidy typu B

HBeAg - Hepatitis B envelope Antigen, obalový antigen viru hepatitidy typu B

HBsAg – Hepatitis B surface Antigen, australský antigen, povrchový antigen viru hepatitidy typu B

HBV – hepatitis B virus, virus hepatitidy typu B

HCC - hepatocellular carcinoma, hepatocelulární karcinom

HCV – hepatitis C virus, virus hepatitidy typu C

HIV - Human Immunodeficiency Virus, virus selhání lidského imunitního systému

HIV EIA - Human Immunodeficiency Virus Enzyme Immunoassay, enzymová imunoanalýza pro průkaz viru HIV

HTLV - human T-lymphotropic virus, lidský T-lymfotropní virus

IgM – imunoglobulin třídy M

IN – integrase, virová integráza

LAV - Lymphadenopathy Associated Virus

MEIA – Microparticle Enzyme Immunoassay, enzymová imunoanalýza na mikročásticích

MP-NAT – “minipool, Nucleic Acid Test, test pro průkaz nukleových kyselin ve směsných vzorcích dárců krve

NAT - Nucleic Acid Test, test pro průkaz nukleových kyselin

NRL – Národní referenční laboratoř

ORF - open reading frames, otevřené čtecí rámce

PCR – polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce

PR – protease, virová protéza

RIA – Radioimmunoassay, radioimunoanalýza

RIBA - recombinant immunoblot assay, rekombinantní imunoblot analýza

RNA - ribonucleic acid, ribonukleová kyselina

RRR - Rapid Reagin Reaction, rychlá „reaginová“ reakce

RT – reverse transcriptase, reverzní transkriptáza

ssRNA - single stranded ribonucleic acid, jednovláknová ribonukleová kyselina

SZÚ – státní zdravotnický ústav

TEM - transmisní elektronová mikroskopie

TPHA - *Treponema pallidum* Haemagglutination Assay, test na průkaz onemocnění syfilis

URF - Unique recombinant forms, unikátní rekombinantní formy

USA – United States of America, Spojené státy americké

US FDA – US Food and Drug Administration, americký úřad pro kontrolu léčiv

VDRL - Venereal Diseases Research Laboratory, test na průkaz onemocnění syfilis

VL – viral load, virová nálož

WB – western blot

WHO - World Health Organization, Světová zdravotnická organizace

WNV – West Nile virus, virus západonilské horečky

1. CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce je podat přehledně souhrnné informace, týkající se problematiky transfuzního lékařství se zaměřením se na infekční agens, které se podílejí na infekcích přenášených krví a krevní transfuzí a na legislativní nároky stahující se na krev a krevní deriváty pro možné použití v humánní medicíně. Jednotliví původci infekčních onemocnění budou krátce popsáni: bude zmíněn jejich objev, taxonomie, struktura, způsoby přenosu a dále pak způsoby detekce v biologickém materiálu pro potřeby transfuzního lékařství.

1.1. SOUHRN

Tato diplomová práce nabízí stručný přehled běžně vyšetřovaných infekčních agens v transfuzním lékařství, některých zemí EU a USA. Dále pak v této práci je porovnáván rozsah vyšetřovaných parametrů a volených vyšetřovacích metod v různých zemích světa.

V diplomové práci je popisována základní charakteristika (taxonomie, struktura, přenos a diagnostika) infekčních agens, které jsou přenášeny krví a krevní transfuzí. Jmenovitě se jedná o: virus lidské imunodeficiency, virus hepatitidy typu B a C, bakterie *Treponema pallidum*, lidský T-lymfotropní virus, virus zapadonilské horečky a prvoka *Trypanosoma cruzi*.

Během posledních dvaceti let jsou vidět obrovské úspěchy v zajištění bezpečnosti krve. Byly zaznamenány objevy nových infekčních původců jako je virus - HIV, virus hepatitidy typu C, dále byly zavedeny nové testovací systémy a technologie, které jsou v současné době běžnou součástí screeningu dárců krve.

Mezi nové vyšetřovací metody patří bezesporu detekce nukleové kyseliny příslušného infekčního agens. Jelikož je tato metoda ekonomicky i instrumentálně náročná, používá se převážně ve formě tzv. „směsných vzorků“, MP-NAT („minipool“, Nucleic Acid Test), kdy je 6-16 vzorků od dárců krve alikvotně smícháno, a až poté je provedena polymerázová řetězová reakce. Hlavní výhodou této metody je zkrácení „diagnostického okna“.

1.1. SUMMARY

This thesis offers a brief overview of commonly detected infectious agents in blood transfusion medicine in some countries of the EU and the USA. The comparison of the spectrum of investigated parameters and selected testing methods in different countries of the world is further presented in this thesis.

The basic characteristics (taxonomy, structure, transmission and diagnostics) of infectious agents transmitted via blood and blood transfusion is described in this thesis. Namely, it is a human immunodeficiency virus, hepatitis B and C virus, bacterium *Treponema pallidum*, human T-lymphotropic virus, West Nile virus and protozoan *Trypanosoma cruzi*.

In the last twenty years decade, there are noted terrific achievements in blood safety. The discovery of new infectious agents such as HIV, hepatitis type C, as well as implementation of new testing systems and technologies, which presently form ordinary part of blood donors screening, was noted.

Among the new testing methods belongs undoubtedly nucleic acid detection of infectious agents. Because of expensiveness and technical difficulty of this method, minipool nucleic acid test for analysis of aliquot pooled 6-16 blood donors samples with subsequent polymerase chain reaction is carried out. The main advantage of this method is the shortening of „diagnostic window period“.

1.2. ÚVOD

Krví a krevní transfuzí lze přenést prakticky každou infekci, jejíž původce se alespoň po krátkou dobu objeví v krevním řečišti. Z praktického hlediska mají význam především infekce, jejichž původce cirkuluje v krvi i v období inaparentní infekce nebo bezpříznakového nosičství a infekce se tedy nedá odhalit při předodběrovém posouzení způsobilosti dárce krve (Turek, 2009).

Prakticky celosvětová shoda panuje v názoru na vyšetření tří, z transfuzního hlediska nejzávažnějších virových infekcí: infekce vyvolané virem lidské imunitní nedostatečnosti (HIV, human immunodeficiency virus), virové hepatitidy typu B (HBV; hepatitis B virus) a virové hepatitidy typu C (HCV, hepatitis C virus).

Evropská Unie v rámci záruk bezpečnosti léčby transfuzními přípravky stanovila jako minimální požadavek vyšetření sérologických markerů HIV, HBV a HCV při každém odběru a vyšetření známek infekce na T-lymfotropní virus typu I/II (HTLV I/II, Human T-lymphotropic virus type I/II) u dárců pocházejících z endemických oblastí s tím, že každá členská země může panel vyšetření rozšířit (a nemusí rozšíření nijak zdůvodňovat / obhajovat) (Turek, 2009).

Mezi další infekční nemoci, které se ve světě často analyzují pro potřeby transfuzního lékařství patří: virová infekce vyvolaná virem HTLV I/II, Chagasova nemoc (Americká trypanosomóza) a virová infekce vyvolaná virem západonilské horečky WNV (West Nile virus).

2. TEORETICKÁ ČÁST A

2.1. Virus lidské imunodeficiency

Virus lidské imunodeficiency HIV (Human Immunodeficiency Virus) je příčinou onemocnění zvaného „syndrom získaného selhání imunity“, neboli AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome). Podle statistiky Světové zdravotnické organizace WHO (World Health Organization) má toto onemocnění od roku 1990 do roku 2008 za následek více než 2 miliony úmrtí, 33 milionů lidí žijících s HIV, včetně 2 milionů ve věku 15 let a méně. Zatímco současné antivirové léky výrazně zlepšily délku života pacientů s AIDS, nejsou léky k dispozici všem, rezistence a nežádoucí účinky jsou neustálým problémem (Balakrishnan *et al.*, 2009).

2.1.1. Historie

Onemocnění AIDS bylo poprvé klinicky pozorováno koncem roku 1980 a začátkem roku 1981 v Los Angeles. U pěti mladých homosexuálně orientovaných mužů byla diagnostikována pneumocystová pneumonie, kandidóza dutiny ústní a cytomegalovirová infekce

(http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/june_5.htm).

V téže době se prokázala vzácná rakovina kůže tzv. Kaposiho sarkom u další skupiny mladých mužů v New Yorku a Californii

(<http://www.cdc.gov/hiv/resources/reports/mmwr/pdf/mmwr04jul81.pdf>).

Jelikož bylo popisováno stále více nových případů pneumocystové pneumonie a Kaposiho sarkomu u doposud zdravých lidí, bylo vysloveno podezření, že nově diagnostikované onemocnění je infekčního původu

(<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001096.htm>).

Další případy AIDS byly brzy zaznamenány také u jiných skupin obyvatel, včetně nitrožilních uživatelů drog a hemofiliků (Davis *et al.*, 1983; Masur *et al.*, 1981).

Infekce byla definitivně popsána a pojmenována Centrem pro kontrolu a prevenci nemoci CDC (Centers for Disease Control and Prevention) roku 1982 jako AIDS (<http://www.time.com/time/80days/820727.html>).

V roce 1983, byl identifikován původce AIDS, dvě oddělené výzkumné skupiny nezávisle prohlásily, že původcem onemocnění je retrovirus. Francouzi pojmenovali nově objevený virus LAV (Lymphadenopathy Associated Virus). Americká skupina pojmenovala virus HTLV-III (Human T Leukemia Virus) (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983, Levy *et al.*, 1984).

V květnu roku 1986 byl virus definitivně přejmenován na HIV Mezinárodním výborem pro taxonomii virů (Coffin *et al.*, 1986).

2.1.2. Taxonomie

Baltimorská klasifikace virů řadí druhy HIV-1 a HIV-2 do skupiny VI. – viry s jednovláknovou ribonukleovou kyselinou a reverzní transkriptázou, ssRNA – RT, (single stranded ribonucleic acid - reverse transcriptase), čeleď *Retroviridae*, podčeleď *Orthoretrovirinae*, rod *Lentivirinae* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Root>).

Existují dva typy lidských virů imunitní nedostatečnosti, HIV-1 a HIV-2, oba jsou patogenní výhradně pro člověka. HIV-1 a HIV-2 se od sebe antigenně i geneticky liší. Genom těchto virů je podobný, i když HIV-1 se odlišuje absencí genu *vpx* a přítomností genu *vpu*. Funkce *vpx* genu není jasná, předpokládá se, že hraje roli v jaderném transportu (Fletcher *et al.*, 1996).

Na základě genetických rozdílů především v *env* oblasti genomu se HIV-1 člení do tří skupin: M (major-hlavní typ), O (outliers-vedlejší typ) a N (non-M-non-O). Skupina M je v podstatě zodpovědná za světovou epidemii. Kmeny v ní zahrnuté se rozdělují do 9 odlišných subtypů A až K a mezi subtypy vznikají

četné rekombinantní formy. Tyto rekombinantní formy jsou nazývány CRF (circulating recombinant forms) a URF (Unique recombinant forms). Skupiny O a N jsou zatím bez subtypů (Krejsek a Kopecký, 2004).

2.1.3. Přenos infekce

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

HIV-1 se přenáší přímým pohlavním stykem, a to buď homosexuálním nebo heterosexuálním, krví nebo krevními produkty, z infikované matky na dítě a to buď v průběhu gravidity a zejména během porodu, nebo prostřednictvím mateřského mléka. Neexistuje žádný důkaz, že HIV-1 může být přenášen prostřednictvím běžného kontaktu, nebo po kousnutí hmyzem, jako jsou komáři (http://books.google.cz/books?id=Awcmfx8EaOAC&dq=retroviruses+coffin&printsec=frontcover&source=bn&hl=cs&ei=krRXTKLvA4eNOKyt_fMI&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=4&ved=0CCsQ6AEwAw#v=onepage&q&f=false).

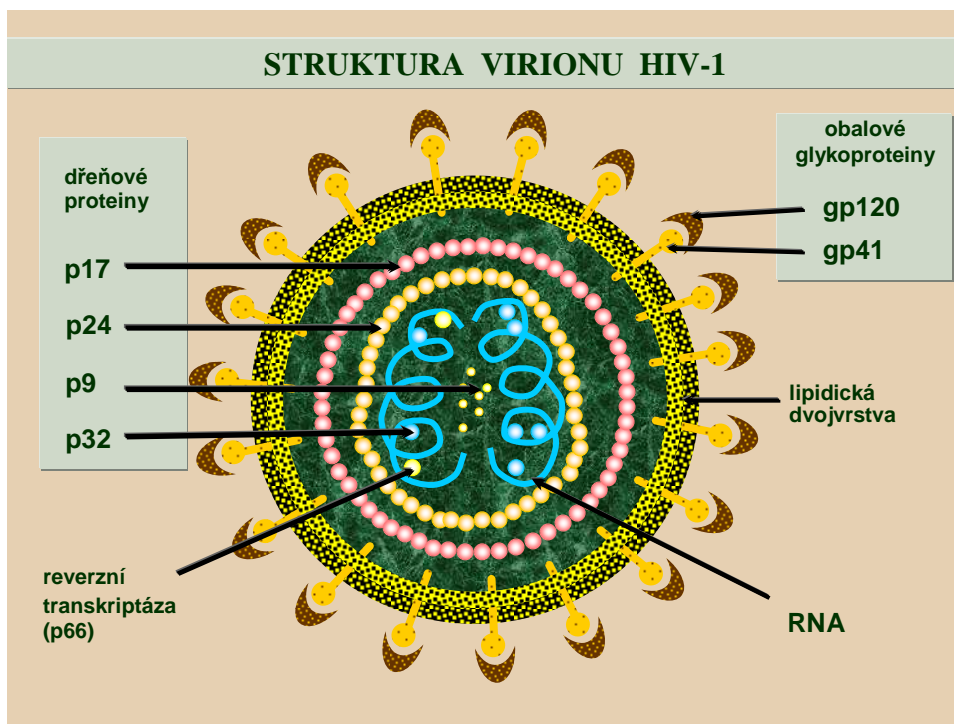
Na rozdíl od široce rozšířeného výskytu infekce HIV-1, je výskyt infekce HIV-2 primárně omezen na západní Afriku. Skupina HIV-2 je méně přenosná pohlavním stykem oproti HIV-1. To může být způsobeno nižší virovou replikací během primární a pozdní infekce. Pozdní stádium nemoci (období zvýšeného virového zatížení) HIV-2 se také vyvíjí pomaleji než u HIV-1. Tyto důvody mohou částečně vysvětlovat omezené světové rozšíření HIV-2 ve srovnání s HIV-1 (<http://www.cdc.gov/hiv/resources/factsheets/hiv2.htm>).

2.1.4. Struktura

Virová částice (Obr. č. 1) je kulatá a má průměr kolem 110 nm. Jádro viru (core) má konický tvar a svým složením a funkcí odpovídá nukleokapsidě jiných

virů. Zevní obal viru je tvořen fosfolipidovou membránou, která je odvozena z membrány infikované buňky. Prostor mezi jádrem a zevním obalem je vyplněn matrixovým proteinem. Jádro viru obsahuje dvě samostatná vlákna RNA, která nesou 9 genů. Nejvýznamnější z nich jsou geny *gag*, *pol* a *env*. Tyto geny kódují nejméně 15 virových proteinů (Allan *et al.*, 1985, Robey *et al.*, 1985, Veronese *et al.*, 1985).

Obr. č. 1 Struktura virionu HIV-1 převzato z (www.lfhk.cuni.cz/ukia/vyuka/aids.pps)



Legenda:

p – protein

gp – glykoprotein

RNA – ribonukleová kyselina

2.1.5. Diagnostika

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 (enzyme linked immunosorbent assay) 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). Vyšetření dárců krve na infekci HIV v České republice se datuje od 1. června 1987.

V současné době patří mezi rutinní metody vyšetření HIV/AIDS nepřímý průkaz viru-stanovení protilátek HIV-1/2 společně s přímým průkazem viru detekcí antigenu p24 metodou ELISA (enzyme linked immunosorbent assai) nebo MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay). Sérologické vyšetření na přítomnost viru lidské imunodeficiency, pomocí specifických protilátek - enzymoimunoanalýzy EIA (enzyme immunoassay), zůstává nejpraktičtější způsobem screeningu infekce HIV-1/2.

Screeningový test, HIV EIA (Human Immunodeficiency Virus Enzyme Immunoassay, enzymová imunoanalýza pro průkaz viru HIV) je ekonomický a pohodlný způsob testování mnoha vzorků najednou. Významné zlepšení bylo dosaženo u testů 3. generace, verze je velice citlivá, zkracuje diagnostické okno na 19. dní (95% interval spolehlivosti). Potřeba zkrátit dobu detekce a také genetická rozmanitost viru, vedly k zdokonalování enzymoimunoanalýzy. Tyto problémy budou vždy přítomny a slouží jako připomínka, že kvalita testování HIV musí být neustále monitorována (Kim et al., 2009).

V průběhu let byly vyvinuty čtyři generace komerčních testů metody EIA pro průkaz infekce vyvolané HIV. Lze jimi detekovat protilátky třídy IgG, IgM a čtvrtou generací lze detekovat virovou kapsidu p24 (Marquez et al, 2008).

Každý reaktivní výsledek je nutno ověřit specifičtější metodou (např. Western blotem) nebo pomocí polymerázové řetězové reakce PCR (polymerase chain reaction).

Konfirmaci reaktivních vzorků zajišťuje v České republice Státní zdravotnický ústav (SZÚ), Národní referenční laboratoř (NRL) pro AIDS, se sídlem Šrobárova 48 ,Praha 10.

K detekci HIV infekce u dárců krve v USA, Polsku, Rakousku a v Německu se v posledních letech využívá metoda průkazu nukleových kyselin ve směsných vzorcích MP-NAT („minipool“ - nucleic acid testing). Princip metody spočívá ve smíchávání vzorků od více dárců (dle individuálních vyšetřovacích setů – 6 až 16 vzorků) do jedné dávky. Dávka je následně extrahována, amplifikována a detekována v jedné reakční zkumavce.

2.2. Virus hepatitidy typu B

Virus hepatitidy typu B (HBV) je původem virové hepatitidy, která představuje celosvětový zdravotnický problém současnosti. Je zaznamenáno, že jde o 2 miliardy lidí nakažených na celém světě a přibližně 378 milionů chronických nosičů HBV. Globálně to způsobuje asi 1,2 milionů úmrtí ročně v důsledku různých komplikací, včetně chronické hepatitidy, cirhózy a rakoviny jater (Forbi *et al.*, 2010).

2.2.1. Historie

V roce 1965 objevili Blumberg a spolupracovníci ve Filadelfii u dvou hemofiliků s četnými transfuzemi v anamnéze, protilátku, která reagovala s antigenem v jednom séru z jejich panelu. Vzhledem k tomu, že antigen byl objeven v séru původního obyvatele Austrálie, dostal název australský antigen. Později byl tento antigen nalezen u pacientů s virovou hepatitidou. Za tento objev dostal Blumberg, v roce 1977 Nobelovu cenu (Beneš *et al.*, 2009).

2.2.2. Taxonomie

Virus hepatitidy B je řazen do čeledi *Hepadnaviridae*, rodu *Orthohepadnavirus*. Dle Baltimorské klasifikace se řadí do skupiny VII. – viry s dvouvláknovou deoxyribonukleovou kyselinou s reverzní transkriptázou dsDNA-RT (double stranded deoxyribonucleic acid – reverse transcriptase)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Root>).

U HBV rozlišujeme čtyři hlavní sérotypy (adr, adw, ayr, ayw) na základě antigenních epitopů, které jsou přítomny na povrchu viru (Magnius a Norder, 1995).

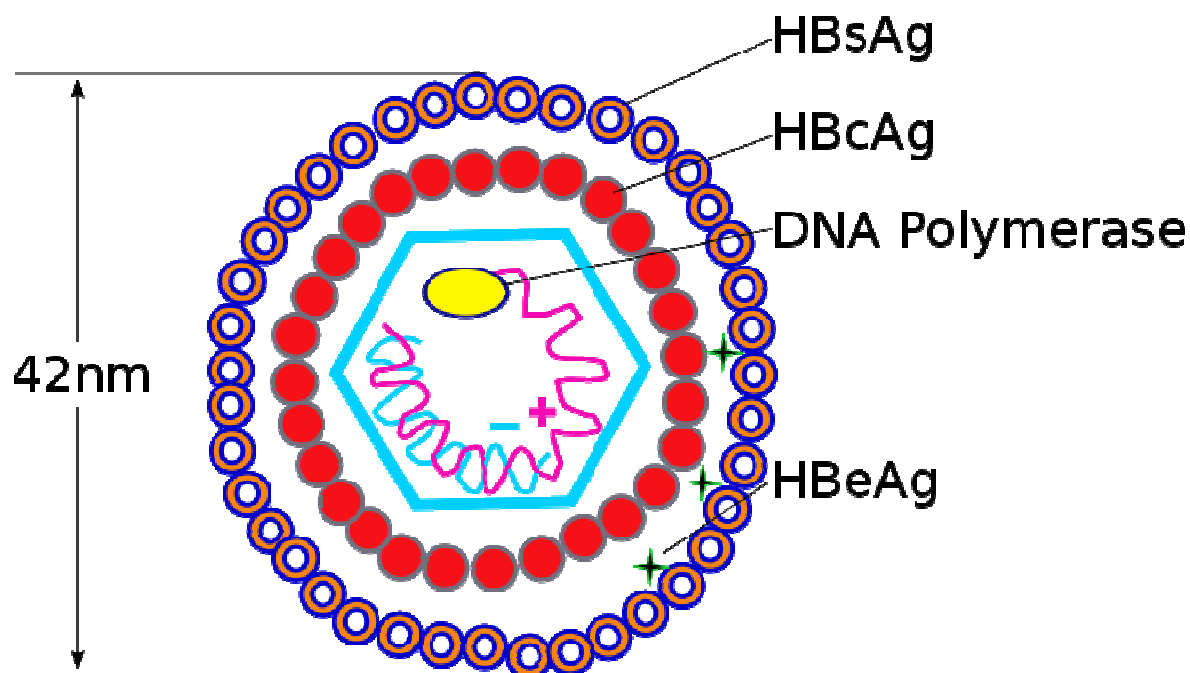
Genotypová klasifikace je založena na kompletní analýze nukleotidových sekvencí genomu viru. V současnosti je známo 8 různých genotypů HBV, označovaných A - H. Genotypy mají odlišné geografické rozšíření a jsou používány při sledování vývoje a přenosu viru. Rozdíly mezi genotypy mají vliv na závažnost onemocnění, průběh, pravděpodobnost komplikací, a odpověď na léčbu a případně očkování (Kramvis *et al.*, 2005).

2.2.3. Struktura

Virus hepatitidy B (Obr. č. 2) je malý obalený DNA virus o průměru 42 nm. Součástí obalu je povrchový (surface) protein, nazývaný též australský antigen, HBsAg (Hepatitis B surface Antigen). Dřeň viru obsahuje kromě virové DNA ještě DNA polymerázu a dále dřeňový (core) antigen HBcAg (Hepatitis B core Antigen) a rovněž glykoprotein nazývaný HBeAg (Hepatitis B envelope Antigen) podle anglického slova envelope (obal). Teprve dodatečně se ukázalo, že tento protein není součástí obalu, nýbrž stavební podjednotkou dřeně. Pomocí elektronového mikroskopu lze v séru infikovaných pacientů zobrazit dva typy virových částic. Kromě kompletních virionů (tzv. Daneových částic) vznikají v průběhu replikace i drobné válcovité nebo kulovité částice o průměru 20 nm, které jsou složeny z nadbytečně vytvořeného antigenu HBsAg. Tyto částice jsou neinfekční, protože neobsahují DNA (Liang, 2009).

DNA genom HBV obsahuje čtyři otevřené čtecí rámce ORF (open reading frames). (ORFs: S, C, P, a X), které kódují povrchové bílkoviny, proteiny jádra, polymerázy, a multifunkční nestrukturální protein X (Ganem a Schneider, 2001, Hollinger *et al.*, 2001).

Obr. č. 2 Struktura virionu hepatitidy B (tzv. Daneova částice), převzato z: (http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hepatitis_B_virus_v2.png)



Legenda:

HBsAg - Hepatitis B surface Antigen, australský antigen, povrchový antigen viru hepatitidy typu B

HBcAg - Hepatitis B core Antigen, jaderný antigen viru hepatitidy typu B

HBeAg - Hepatitis B envelope Antigen, obalový antigen viru hepatitidy typu B

DNA Polymerase - deoxyribonucleic acid Polymerase, Polymeráza deoxyribonukleové kyseliny

2.2.4 Přenos

HBV je přenášena perkutánní nebo slizniční expozicí infikované krve nebo jiných tělních tekutin (sperma, vaginální sekret, sliny). Nejvyšší koncentrace infekčních částic HBV jsou nalézány v krvi. HBV infekce je efektivně přenášena heterosexuálním i homosexuálním pohlavním stykem. K přenosu HBV může také docházet v situacích, kdy je častý a dlouhodobý osobní kontakt s infikovanou

osobou, při intravenózní aplikaci drog. A v neposlední řadě i vertikální přenos z matky na dítě nejčastěji během porodu (Shepard *et al.*, 2006).

2.2.5. Diagnostika

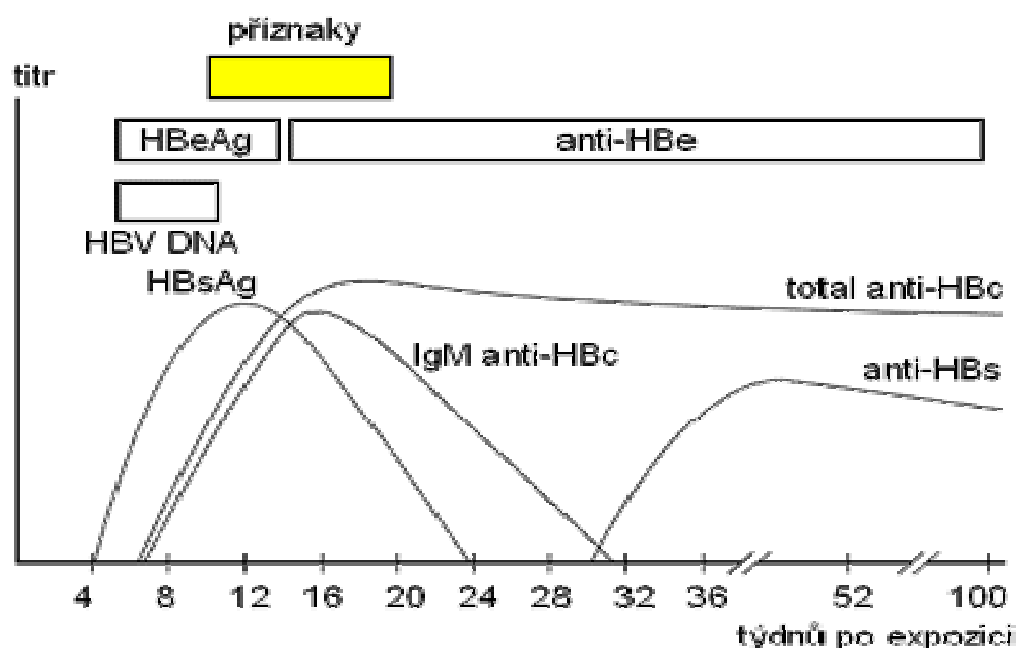
Na začátku roku 1970, byly vyšetřovány virologické nemoci v krevních bankách, například antigen viru hepatitidy typu B poloautomaticky radioimunoanalýzou RIA (radioimmunoassay) nebo poněkud těžkopádným hemaglutinačním testem. V roce 1976, Organon Teknika vyvinula a uvedla na trh velmi úspěšný systém enzymoimunoanalýzy pro detekci HBsAg (Lequin, 2005).

Typický průběh akutní hepatitidy typu B, je na Obr. č. 3, HBV DNA je v krvi detekována nejdříve. Krátce poté lze s úspěchem detekovat antigeny HBsAg a HBeAg. HBsAg může být detekován již 1. a 2. týden, nebo až v 11. a 12. týdnu po expozici, a jeho přetrvání v organismu je známkou chronicity. HBeAg obvykle vymizí, na vrcholu klinického onemocnění, vzhledem k tomu, HBsAg a HBV DNA obvykle přetrvávají v séru po dobu trvání klinických příznaků. Protilátky proti HBcAg (anti-HBc - anti Hepatitis B core Antigen), se obvykle objeví krátce před projevem klinických příznaků. Protilátky proti HBeAg (anti-HBe - anti Hepatitis B envelope Antigen) se obvykle objeví krátce po vymizení HBeAg, často na vrcholu klinického onemocnění, což je významným důkazem, že se pacient uzdraví. Protilátky proti HBsAg (anti HBs – anti Hepatitis B surface Antigen) vznikají pozdě v průběhu infekce a přetrvávají i po zotavení (Liang, 2009).

Diagnostika v transfuzním lékařství se donedávna opírala převážně o vyšetření HBsAg metodou ELISA. V poslední době bývá vyšetření doplňováno o diagnostiku protilátek se specifitou proti core antigenu, anti-HBc. Na dnešním trhu je k dispozici řada kvalitních vyšetřovacích setů např. Architekt HBsAg test (Abbott Chicago) a Ortho Anti-HBc test (Ortho Diagnostic Systems Neckargemünd Německo).

Obr. č. 3. Sérologické markery akutní hepatitidy B převzato z:

(<http://inf3.lf1.cuni.cz/~hrozs/vhakupch1.htm>)



Legenda:

HBsAg – Hepatitis B surface Antigen, australský antigen, povrchový antigen viru hepatitidy typu B

HBsAg – Hepatitis B surface Antigen, australský antigen, povrchový antigen viru hepatitidy typu B

anti-HBe – anti- Hepatitis B envelope, protilátky proti antigenu obalu hepatitidy typu B

anti-HBs – anti Hepatitis B surface, protilátky proti antigenu povrchu hepatitidy typu B

total anti-HBc – total anti Hepatitis B core, celkové protilátky proti jadernému antigenu hepatitidy typu B

IgM anti-HBc – Ig M anti Hepatitis B core, protilátky proti jadernému antigenu hepatitidy typu B, protilátky třídy M

HBV DNA – Hepatitis B virus deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina viru hepatitidy typu B

Porovnáme-li citlivé sérologické HBsAg testy se standardním vyšetřením HBV DNA, pomůže nám tento test jen o málo snížit diagnostické okno pro infekci HBV. Vzhledem k pomalé replikaci HBV v rané fázi infekce, jen velmi citlivý individuální HBV DNA test (např. s detekčním limitem 50 kopií / ml nebo méně) by pomohl předejít většímu počtu nezjištěných infikovaných dárců. Jiný přístup, který vede ke snížení přenosu HBV, spočívá v zavedení dalšího testování a to anti-HBc testování, které dovoluje odhalit chronické HBV nosiče s velmi nízkou virovou zátěží. Existují důkazy, že krevní složky, které obsahují protilátky se specifitou proti core antigenu a protilátky se specifitou proti surface antigenu nepřenášejí HBV (Offergeld, 2005). Všechny opakovaně reaktivní vzorky jsou zasílány ke konfirmačnímu vyšetření, které pro ČR zajišťuje Státní zdravotnický ústav (SZÚ), Národní referenční laboratoř (NRL) pro virové hepatitidy, se sídlem Šrobárova 48, Praha 10.

2.3 Virus hepatitidy typu C

Virus hepatitidy typu C (HCV) je původcem virové hepatitidy. Infekce, která patří mezi hlavní problémy veřejného zdraví. Zaznamenáno je, 170 milionů infikovaných lidí po celém světě a 2 - 3 miliony nových případů ročně. V západních zemích je HCV infekce nejčastějším původcem hepatocelulárního karcinomu, což v důsledku vede k transplantaci jater a má za následek smrt asi 10 000 lidí ve Spojených státech každý rok (Ryan *et al*, 2010).

2.3.1 Historie

Před více než 30 lety bylo zjištěno, že kromě hepatitid A a B existuje další, pravděpodobně virové onemocnění jater, které bylo označeno jako hepatitida non-A, non-B. V roce 1989 byl identifikován původce onemocnění, jenž byl označen jako virus hepatitidy C (Choo *et al.*, 1989).

V roce 1990 se podařilo vyrobit protilátky proti virovým antigenům získaných technologiemi molekulární genetiky a zajistit tak možnost nepřímého průkazu viru v krvi. V roce 1992 bylo zavedeno plošné testování dárců krve a v roce 1995 se poprvé podařilo zobrazit virus pomocí elektronového mikroskopu (<http://www.abbottdiagnostics.cz/nove-produkty/rok-2009/imunoanaliza/architect-hcv-ag.html>).

2.3.2 Taxonomie

Virus hepatitidy typu C patří do čeledi *Flaviviridae*. Nejnověji byl klasifikován jako zatím jediný zástupce rodu *Hepacivirus*. Dle Baltimorské klasifikace je řazen

do skupiny IV – viry s jednovláknovou pozitivní ribonukleovou kyselinou, (+) ssRNA (single stranded ribonucleic acid)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Root>).

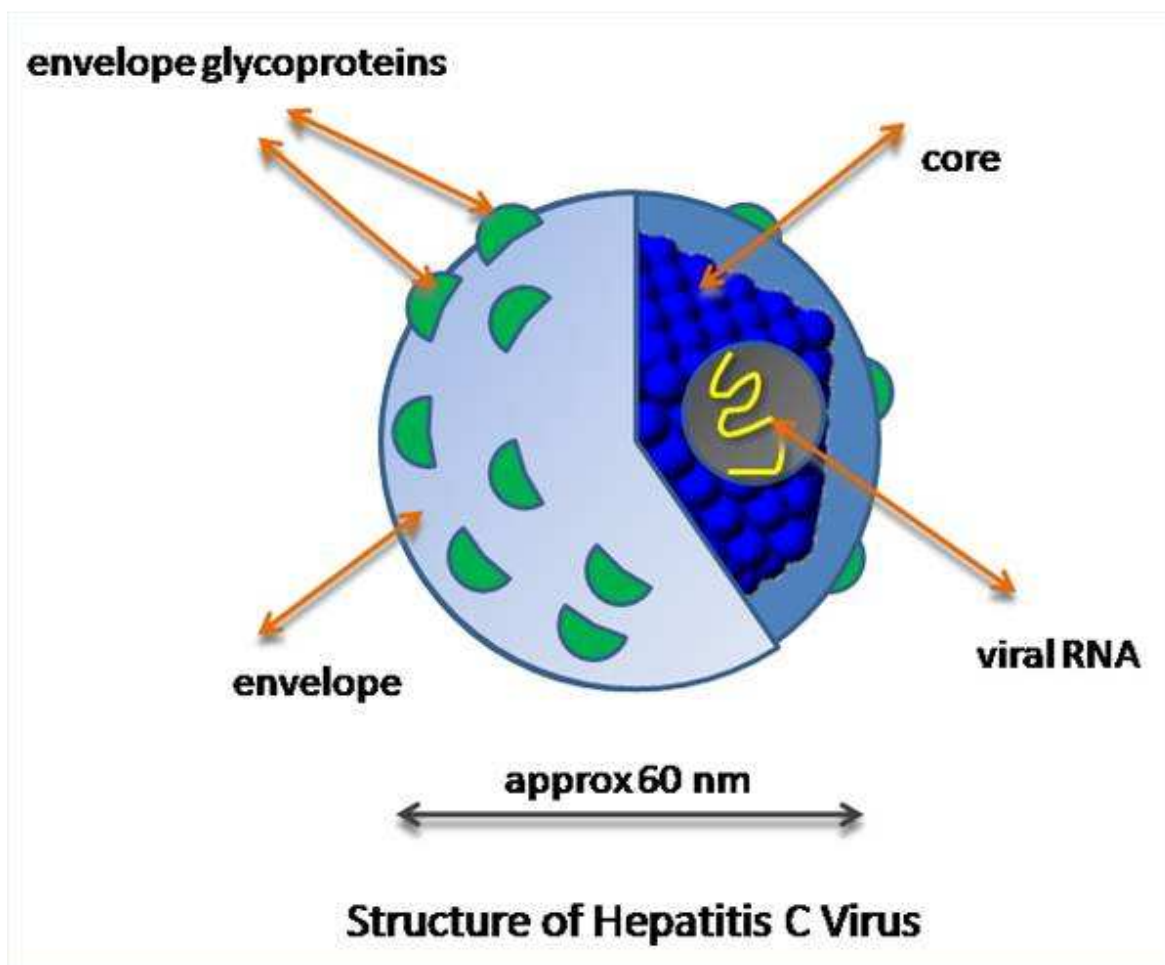
Zatím bylo popsáno šest hlavních genotypů (HCV-1 až HCV-6), z nichž každý obsahuje více podtypů (např. 1a, 1b, atd.), (Qiu et al., 2009).

2.3.3 Struktura

HCV je obalený RNA virus o průměru 60 nm (Obr. č. 4.), má jednovláknitý RNA genom, obsahující asi 9 600 nukleotidů. Mezi strukturální proteiny patří protein tvořící nukleokapsidu viru a E1 a E2 glykoproteiny, které tvoří obal viru. Dále genom obsahuje nestrukturální proteiny NS2 až NS5 a RNA polymerázu. Nově zjištěné enzymy (serinová proteáza, RNA helikáza, na RNA závislá RNA polymeráza) jsou nezbytné pro replikaci viru a staly se cílem nových antivirotik (Moradpour et al., 2001).

Obr. č. 4. Struktura virionu viru hepatitidy typu C převzato z:

([http://www.thenakedscientists.com/HTML/content/interviews/interview/1149/!](http://www.thenakedscientists.com/HTML/content/interviews/interview/1149/))



Legenda:

Envelope glycoproteins – glykoproteiny obalu

core – jádro

envelope – obal

viral RNA – virová RNA

approx 60 nm – přibližný průměr 60 nm

2.3.4 Přenos

Sexuální přenos hepatitidy typu C je mnohem méně častý než u hepatitidy typu B. Podle amerických statistik je séroprevalence infekce HCV mezi sexuálními partnery, osob žijících dlouhodobě v monogamním svazku 2-3%. V případě, že se jedná o osoby, které mají více sexuálních partnerů, prostitutky či prostitutky nebo homosexuální muže, narůstá tato prevalence na 4-6%.

K parenterálnímu přenosu infekce HCV krevními transfuzemi a krevními deriváty docházelo před zavedením rutinního testování dárců. Ve vyspělých státech světa ztratila tato cesta přenosu infekce v současnosti na významu. Nejohroženější skupinou jsou jednoznačně intravenózní narkomani, kteří si navzájem půjčují injekční stříkačky a jehly. Rizikové aktivity představují také tetování a piercing, pokud nejsou prováděny za aseptických podmínek. Společné sdílení osobních věcí, které mohou být kontaminovány krví, jako jsou zubní kartáčky, holící strojky apod., představují další možnou cestu přenosu infekce.

Vertikální přenos z matky na dítě je také relativně vzácný, proto pravděpodobnost infikování dítěte během porodu je < 6% (Husa, 2005).

2.3.5. Diagnostika

Diagnostika hepatitidy typu C je založena na sérologických testech k průkazu specifických protilátek anti-HCV (anti-Hepatitis C virus) a na molekulárních technikách detekce ribonukleové kyseliny viru hepatitidy typu C HCV RNA (ribonucleic acid hepatitis C virus). Z nich se dnes užívá polymerázová řetězová reakce k průkazu virové reverzní transkriptázy RT-PCR (reverse transcriptase - polymerase chain reaction) a analýza „branched DNA (bDNA)“ (Moradpour *et al.*, 2001).

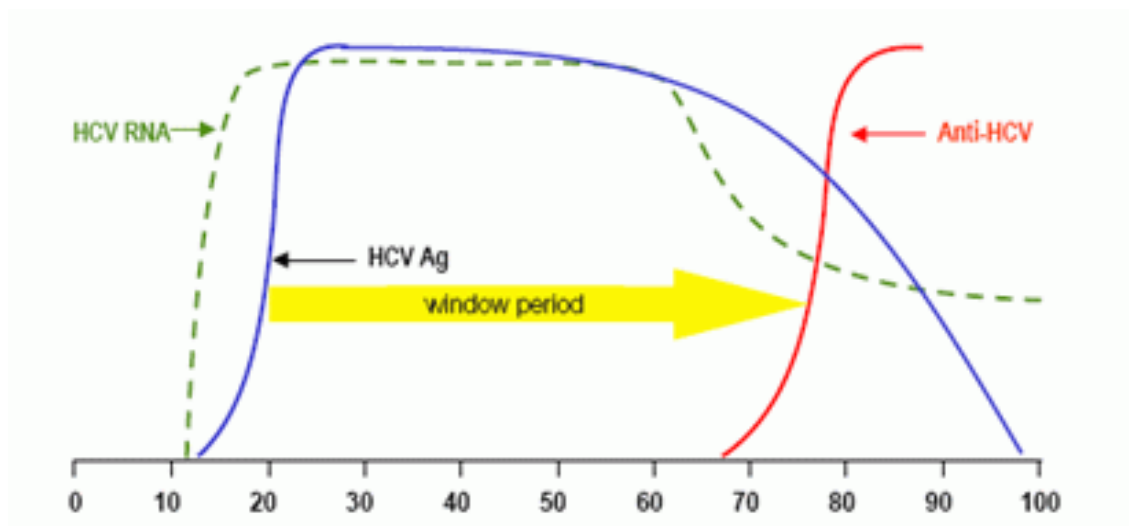
Třetí generace ELISA testů k průkazu anti-HCV je velmi citlivá i specifická. Slouží jako primární diagnostické testy, jsou však méně citlivé u imunokompromitovaných osob, nebo u osob léčených hemodialýzou. U nich

negativní nález v ELISA testech nevyklučuje infekci HCV a je třeba vyšetření doplnit o RT-PCR. Rekombinantní imunoblot analýza RIBA (recombinant immunoblot assay) je doplňkovým vyšetřením, které se užívá k potvrzení positivity ELISA testů, zvláště u osob z populace s nízkým rizikem infekce HCV. V těchto případech negativní nález v RIBA vylučuje infekci. Dosud není k dispozici rutinně použitelný sérologický test k detekci antigenu viru (Moradpour *et al.*, 2001).

Detekce anti-HCV je pozitivní zhruba až po 70 dnech nákazy. Detekcí nukleové kyseliny viru HCV se "imunitní okno" zkrátí na pouhých 8-10 dnů (Busch a Kleinman, 2003).

Obr. č. 5: Znárodnění sérologického profilu během HCV infekce převzato z:

(<http://www.abbottdiagnostics.cz/nove-produkty/rok-2009/imunoanaliza/architect-hcv-ag.html>)



Legenda:

window period – sérologické okno

HCV Ag – antigen viru hepatitidy typu C

HCV RNA – ribonukleová kyselina viru hepatitidy typu C

Anti-HCV – protilátky proti viru hepatitidy typu C

Pomocí RT-PCR lze zjistit infekci HCV již za 1-2 týdny po nákaze a 4-6 týdnů před objevením se anti-HCV (Obr. č. 5). Průkaz HCV RNA je především důležitý pro výběr pacientů k antivirové terapii a k odhadu její úspěšnosti. Pozitivita ELISA testů a RT-PCR slouží k odlišení pacientů s chronickou hepatitidou C od osob po překonání infekce, u nichž mohou anti-HCV přetrvávat i desítky let. Novější studie však překvapivě ukazují, že hladiny anti-HCV u mnoha uzdravených pacientů časem klesají (Moradpour *et al.*, 2001).

V České republice je nejrozšířenější souprava Amplicor HCV firmy Roche, která poskytuje spolehlivé výsledky (Zima *et al.*, 2007).

Odlišení genotypu 1 viru od genotypů 2 a 3, stejně jako stanovení výšky hladiny virémie, se stalo významné pro volbu optimálního léčebného postupu (Moradpour *et al.*, 2001).

Všechny opakovaně reaktivní vzorky jsou zasílány ke konfirmačnímu vyšetření, které pro ČR zajišťuje Státní zdravotnický ústav (SZÚ), Národní referenční laboratoř (NRL) pro virové hepatitidy, se sídlem Šrobárova 48, Praha 10.

2.4. T-lymfotropní virus 1/2

T-lymfotropní virus 1 HTLV-1 (human T-lymphotropic virus 1) je prvním lidským retrovirem, u něhož byla prokázána souvislost s malignitou, jmenovitě s T-buněčnou leukémií/lymfomem dospělých. HTLV-1 se vyskytuje především v Japonsku, kde séroprevalence dosahuje až 16%, v centrální Africe, v Karibské oblasti a také u australských domorodců. Sporadické případy se vyskytují po celém světě. V Evropě je séroprevalence pod 0,5% (Beneš *et al.*, 2009, Manns *et al.*, 1999).

T-lymfotropní virus 2 HTLV-2 (human T-lymphotropic virus 2) byl popsán zejména u injekčních uživatelů drog a jejich sexuálních partnerů, stejně jako v populacích původních indiánských kmenů. Infekce je endemická v populaci injekčních uživatelů drog v USA, Evropě, Jižní Americe a jihovýchodní Asii (Martín-Dávila, 2008).

2.4.1. Historie

Poprvé byl tento retrovirus izolován roku 1980 z buněčné linie, získané od Američana s diagnózou T-buněčný lymfom kůže (Poiesz *et al.*, 1980). Ve skutečnosti trpěl T-buněčnou leukémií/lymfomem dospělých ATL (adult T-cell leukemia), kterou popsali Japonci už roku 1977. Předpokládalo se, že onemocnění je virového původu a postihuje geneticky disponované osoby. Ukázalo se, že retroviry izolované v Americe a Japonsku jsou shodné, a že šíře jimi vyvolaných potíží je mnohem větší (Manns *et al.*, 1999).

HTLV-2 byl identifikován v buněčné linii odvozené od pacienta s vlasatobuněčnou leukémií, i když další studie nepotvrdila sdružení HTLV-2 s lymfoproliferativním onemocněním (Boxus a Willems, 2009).

2.4.2. Taxonomie

Baltimorská klasifikace virů řadí druhy HTLV-1,2 do skupiny VI. – viry s jednovláknovou ribonukleovou kyselinou a reverzní transkriptázou, ssRNA – RT, (single stranded ribonucleic acid - reverse transcriptase), rod *Deltaretrovirus*, čeleď *Retroviridae*, podčeleď *Orthoretrovirinae*

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Root>).

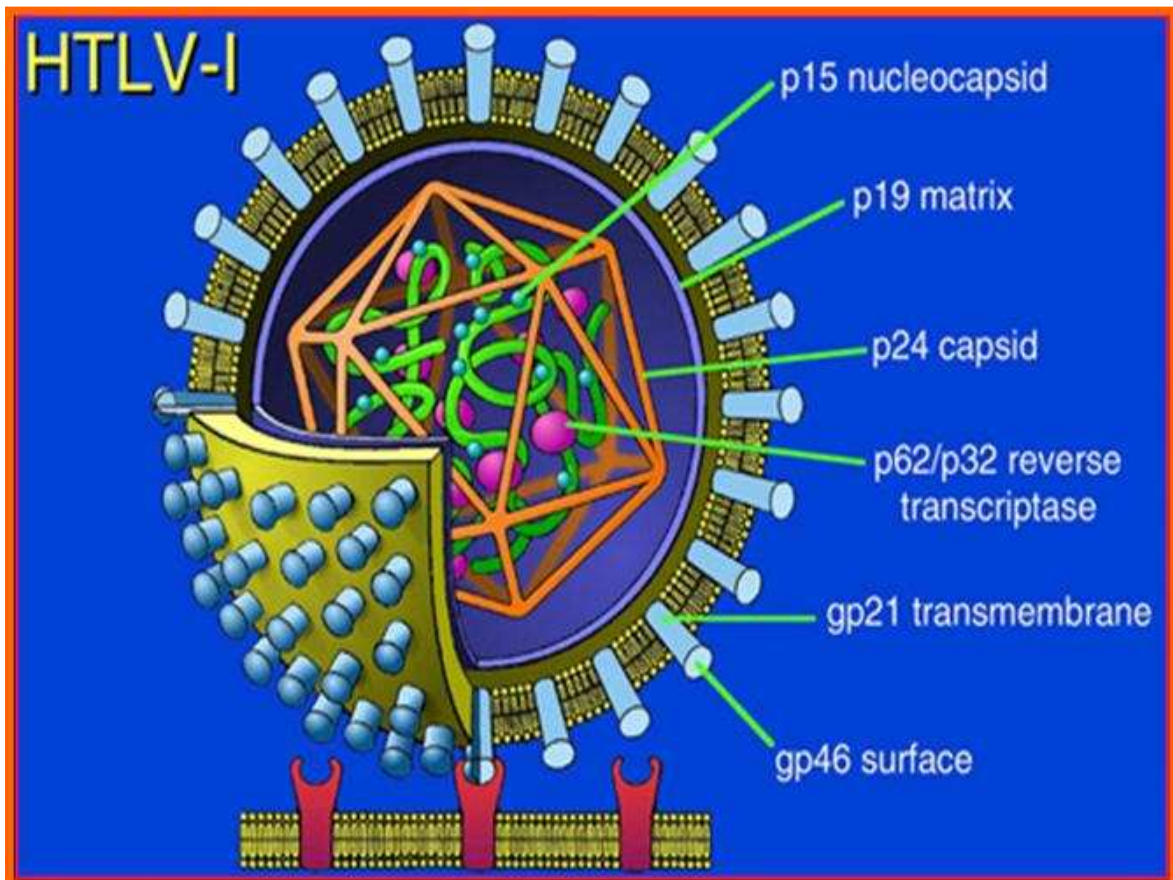
2.4.3. Struktura

Virové částice viru HTLV-1 (Obr. č. 6.) jsou kulovité, v průměru mají velikost 100 nm, vnější obal tvoří glykoproteiny, které kryjí vnitřní protein jádra. Genom HTLV-1 má tři strukturální geny: gen *gag* (kódující vnitřní protein jádra), gen *env* (kódující glykoproteiny gp21 a gp46 vnějšího obalu), gen *pol* (kódující reverzní transkriptázu). Dále obsahuje geny kódující regulační proteiny (*tax*, *rex*). Délka virového genomu HTLV-1 a HTLV-2 je 9,0 a 8,9 kb

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mmed>).

Obr. č. 6. Struktura virionu HTLV-1, převzato z:

(<http://udel.edu/~edcwelch/HTLV.html>)



Legenda:

p15 nucleocapsid – nukleokapsida proteinu p15

p19 matrix – protein obalu jádra p19

p24 capsid – jaderný glykoprotein p24

p62/p32 reverse transcriptase – proteiny reverzní transkriptázy p62/p32

gp21 transmembrane – transmembránový glykoprotein gp21

gp46 surface – povrchový glykoprotein gp46

2.4.4. Přenos

Asi neúčinnější je přenos HTLV-1 při transfuzi krve. Pravděpodobnost nákazy příjemce kontaminované krve je 40-60% a střední doba do vzniku sérokonverze bývá asi 51 dnů. Poprvé byl screening dárců krve zaveden v Japonsku, od prosince roku 1988 se provádí také v USA (Manns *et al.*, 1999).

Pravděpodobnost přenosu HTLV-1 z matky na dítě se pohybuje mezi 18-30%. Přenos pohlavním stykem umožňuje zavlečení nákazy do neendemických populačních skupin. Přenos viru z mužů na ženy je 4x častější než opačným směrem (Manns *et al.*, 1999).

Virus HTLV-2, stejně jako ostatní retroviry, může být přenášen intravenózně, sexuálně, nebo z matky na dítě. HTLV-2 séroprevalence u injekčních uživatelů drog v Severní Americe se pohybuje mezi 8,8% a 17,6% (Zunt *et al.*, 2006).

2.4.5. Diagnostika

Screening dárců krve na HTLV-1 infekci se nyní běžně provádí v oblastech s vysokou prevalencí, jako například v Japonsku. Nicméně provádějí se screeningová vyšetření i v oblastech s nízkou prevalencí např. USA a Francie.

Pro HTLV-1 infekci je inkubační doba 30 až 90 dní před detekcí protilátek v séru. Následující sérokonverze protilátek přetrvává po celý život. Nejčastěji používané sérologické testy jsou enzymoimunoanalýzy, připravené z lyzovaných antigenů HTLV-1 viru. Metody založené na imunofluorescenční vyšetření protilátek IFATs (immunofluorescent antibodies tests) nerozliší mezi jednotlivými typy HTLV-1 a 2 protilátek. Existují další testy, Western blot (WB), nebo radioimunoprecipitační techniky, které usnadní správnou interpretaci reaktivních vzorků. Tyto testy mohou identifikovat protilátky proti jaderným a povrchovým glykoproteinům HTLV-1 a -2. Aby bylo možné považovat výsledek za skutečně pozitivní, vzorky, které jsou opakovaně reaktivní pomocí EIA, musí být potvrzeny vyšetřením pro jaderný glykoprotein (p24) a povrchové glykoproteiny

(gp46 nebo gp61/gp68). WB je nejcitlivější konfirmační test na přítomnost protilátek proti jaderným glykoproteinům P19, P24, a P28, zatímco radioimunoprecipitační metoda je více citlivá k detekci protilátek proti glykoproteinům obalu gp46 a gp61/gp68 (Martín-Dávila, 2008, <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001311.htm>).

2.5. Virus západonilské horečky

Virus západonilské horečky WNV (West Nile virus) byl poprvé detekován na západní polokouli v roce 1999 a od té doby se rychle rozšířil po celém kontinentu Severní Ameriky do všech 48 kontinentálních států, sedmi kanadských provincií a celého Mexika. Podle amerického Centra pro kontrolu a prevenci nemocí CDC (Centers for Disease Control and Prevention), byla v USA od roku 1999 prokázána infekce vyvolaná původcem WNV u více jak 15 000 lidí. Důsledkem infekce WNV bylo rovněž registrováno více jak 500 úmrtí Předpokládá se, že počty infikovaných osob jsou ale mnohem vyšší, než uvádí statistika (<http://westnilevirus.nbii.gov>).

2.5.1. Historie

S největší pravděpodobností se již po staletí na Středním východě vyskytuje infekce obratlovců vyvolaná WNV. Teď se virus šíří do nových oblastí světa a na nové populace. WNV, byl poprvé izolován z krve nemocného v Ugandě v roce 1937. Až do počátku roku 1990, byl virus do značné míry omezen na Afriku, Evropu a Asii. V roce 1941, propukla infekce v Tel Avivu, bez hlášených úmrtí. Během dalších 60 let, došlo k sedmi vzplanutím infekce v Izraeli a jeho okolí. V roce 1999, byl WNV zavlečen do Spojených států a bylo laboratorně potvrzeno 4156 případů (Marr *et al.*, 2003).

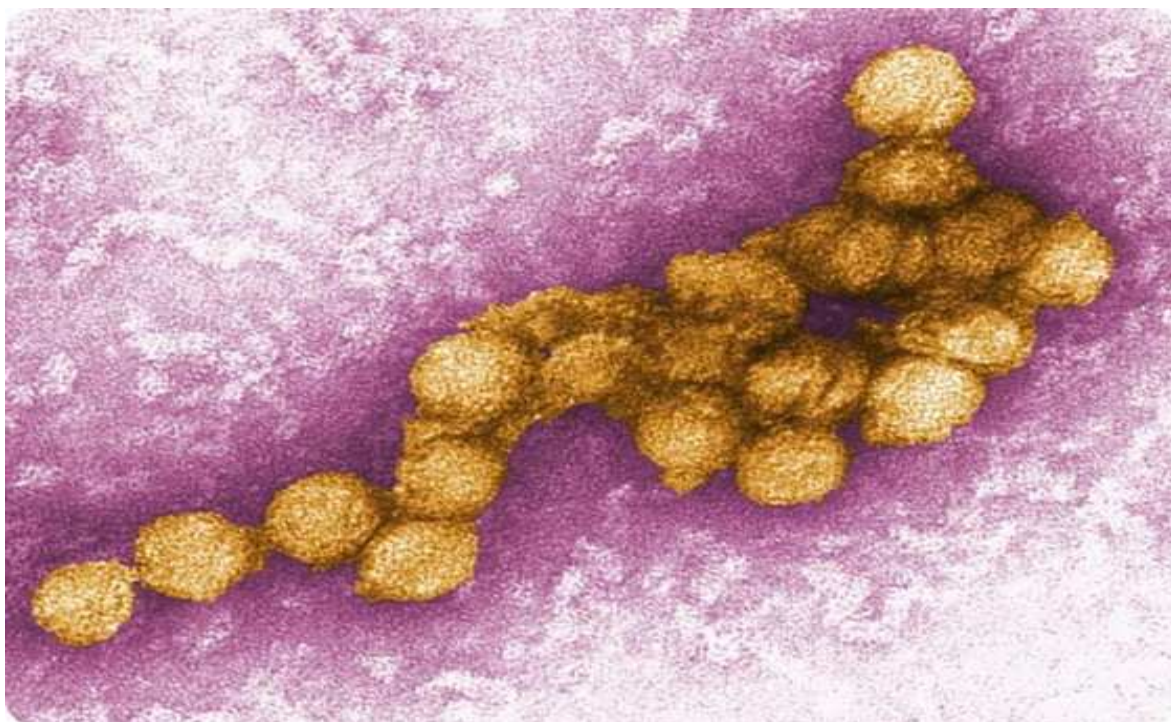
2.5.2. Taxonomie

Dle Baltimorské klasifikace virů patří WNV do skupiny IV - viry s jednovláknovou pozitivní ribonukleovou kyselinou (+) ssRNA (single stranded ribonucleic acid). Virus je taxonomicky řazen do čeledi *Flaviviridae*, rod *Flavivirus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Root>).

2.5.3. Struktura

Virion flaviviru (Obr. č. 7) má sférický tvar s průměrem 40 - 60 nm. Velikost nukleokapsidy je okolo 30 nm, obsahuje kapsidu a genomickou RNA a je obklopena lipidovou dvojvrstvou, ve které je ukotven virový obal se zakotvenými membránovými proteiny. Přibližná délka genomu je 1 kb (kilobazí). Genomická RNA flaviviru obsahuje jeden dlouhý čtecí rámeček. Kodovaný polyprotein je přeložen a posttranslačně modifikován virovými a buněčnými proteázami do tří strukturálních proteinů (C, M, E) a sedmi nestrukturních (ns1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, a NS5) proteinů (Shi et al., 2001).

Obr. č. 7. Snímek pořízený transmisí elektronovou mikroskopií (TEM) virů West Nile (WNV), převzato z: (www.news-medical.net/health/West-Nile-Virus.aspx)



2.5.4. Přenos

Mezi divoce žijícími ptáky, kteří představují rezervoárovou populaci viru, jej přenáší hlavně komáři. Nejčastějším vektorem WNV jsou komáři rodu *Culex*. Ti se živí především krví ptáků, ale některé druhy napadají také lidi. Lidé představují náhodného nebo konečného hostitele v řetězci přenosu WNV. V mírném klimatickém pásmu vznikají infekce WNV jen během teplého ročního období, v němž může dojít k nákaze komárů po sání krve infikovaných ptáků (Craven a Roehring, 2001).

Mezi další možnosti přenosu infekce patří: podání krevní transfuze nebo darování orgánů, přenos z matky na plod během těhotenství nebo kojení (Hayes *et al*, 2005).

2.5.4. Diagnostika

Diagnostika infekce WNV je založena na sérologickém vyšetření, obvykle se detekuje imunoglobulin třídy M (IgM) v séru nebo mozkomíšním moku. WNV IgM protilátky jsou detekovány asi jeden týden po infekci. Antigenní podobnost mezi viry čeledi *Flaviviridae*, kam patří rovněž původci žluté zimnice nebo japonské encefalitidy, může být důvodem získání falešně pozitivních výsledků sérologického vyšetření u osob nedávno očkovaných proti výše zmíněným onemocněním (Lanciotti *et al.*, 2000).

Testování nukleových kyselin NAT (nucleic acid testing) detekuje přítomnost WNV před rozvojem WNV protilátek IgM a je používán k vyšetření dárců krve v průběhu letní sezóny v USA. Screening WNV na transfuzních odděleních je prováděn pomocí detekce nukleové kyseliny infekčních agens ve směsných vzorcích krve MP-NAT (minipool - nucleic acid testing), (Martín-Dávila *et al.*, 2008).

2.6. Bakterie *Treponema pallidum*

Primárně patogenní spirální bakterie *Treponema pallidum* (*T. pallidum*), je původcem onemocnění zvaného syfilis (lues, příjice). Jedná se o chronickou infekční pohlavní chorobu.

2.6.1 Historie

Syfilis byla poprvé pozorována před více než 500 lety, i když bakteriální příčina nebyla stanovena až do roku 1905. Původ nemoci je předmětem debat. Podle jedné teorie se syfilis vyskytovala v oblasti Předního východu od nepaměti. A k jejímu masivnímu rozšíření na přelomu 15. a 16. století přispělo uvolnění mravů. Podle jiného názoru byla syfilis zavlečena do Evropy Kolumbovými mořeplavci roku 1493, kteří se jí nakazili od středoamerických Indiánů (Mays *et al.*, 2003, Naranjo, 1994).

2.6.2 Taxonomie

Taxonomicky je *T. pallidum* řazena: kmen *Spirochaetes*, třída *Spirochaetes*, řád *Spirochaetales*, čeleď *Spirochaetaceae* a rod *Treponema* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Root>).

2.6.3 Struktura

Treponemata jsou mikroaerofilní, gram negativní, spirální organismy, 6-10 μm dlouhé, 0,1-0,2 μm široké s pravidelnými závití (Obr. č. 8). Vnější membrána obsahuje jen velmi málo antigenů je velmi slabě imunogenní. Imunodominantní

proteiny jsou lokalizovány na vnitřní straně membrány, zůstávají skryté imunitnímu systému hostitele. V tom spočívá únikový mechanismus této bakterie - ukrývá se před obrannými mechanismy hostitele

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mmed>).

Obr. č. 8 *T. pallidum* spojená s povrchem lidského lymfocytu. Snímek byl pořízen rastrovacím elektronovým mikroskopem, převzato z:

(www.jci.org/articles/view/12484/figure/1)



2.6.4. Přenos

K přenosu nákazy dochází sexuálním stykem, vertikálně, těsným kontaktem se slizničními a kožními lézemi, při poranění kontaminovanou jehlou a teoreticky i krevní transfuzí. Infikovaní jedinci jsou maximálně infekční v časném stádiu. Později infekčnost klesá, přibližně po čtyřech letech od nákazy nemocní nemohou šířit nákazu sexuální cestou. Branou vstupu je obvykle kůže a sliznice, nejčastěji v oblasti genitálií a dutiny ústní (Beneš *et al.*, 2009).

2.6.5. Diagnostika

Vyšetření dárců krve na syfilis byla v ČR zavedena v roce 1968. V ČR jsou v současnosti využívány ke screeningu dárců krve testy označované zkratkou VDRL (Venereal Diseases Research Laboratory), nebo RRR (Rapid Reagin Reaction) a ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). ELISA se vyšetřuje vždy a některá transfuzní oddělení doplňují o netreponové testy VDRL nebo RRR.

Zatímco se citlivost a specifita testů VDRL a RRR pohybuje v rozmezí okolo 80%, automatizované testy enzymoimunoanalýzy poskytují citlivost a specifitu vyšší jak 95% (Wiwanitkit, 2009).

Sérologické testy na syfilis jsou rozděleny na netreponové a treponemové. Mezi netreponové testy patří Rapid Reagin Reaction (RRR) a Venereal Diseases Research Laboratory (VDRL). RRR a VDRL testy mohou být nespecifické (získání falešně pozitivních výsledků) v řadě případů jako jsou: gravidita, autoimunitní onemocnění, či virové infekce (Bissessor a Chen, 2009).

Mezi treponemové sérologické vyšetření na syfilis patří: *Treponema pallidum* Haemagglutination Assay (TPHA), Fluorescent Treponemal Antibody Absorption Test (FTA-ABS) a ELISA (Bissessor a Chen, 2009).

Každý opakovaně reaktivní vzorek je potvrzen specifickými testy např. Western blotem, či PCR. Reaktivní vzorky jsou zasílány ke konfirmačnímu vyšetření, které pro ČR zajišťuje Státní zdravotnický ústav (SZÚ), Národní referenční laboratoř (NRL) pro syfilis, se sídlem Šrobárova 48, Praha 10.

2.7. Prvok *Trypanosoma cruzi*

Prvok *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) je původcem Chagasovy nemoci známé také jako americká trypanosomóza. Tento parazit je hlavní infekční příčinou morbidity a mortality v Latinské Americe. Odhaduje se, že v současné době je infikováno 8 - 10 milionů lidí. V důsledku nárůstající imigrace ve Spojených státech a Evropě z Latinské Ameriky se také stalo, že v posledních několika desetiletích jde o důležitý zdravotnický problém (Dauby *et al*, 2009). V České republice nebyl dosud import Chagasovy nemoci zaznamenán (Beneš *et al*, 2009).

2.7.1. Historie

Nemoc byla pojmenována po brazilském lékaři Carlosu Chagasovi, který ji popsal 23. dubna roku 1909. Vyvolávající parazit byl poprvé objeven v krvi u tříleté holčičky Bereniky v akutní fázi infekce (Schapachnik *et al*, 2009).

2.7.2. Taxonomie

Druh *T. cruzi* se řadí do řádu *Kinetoplastida*, čeledi *Trypanosomatidae* a rodu *Trypanosoma* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Root>).

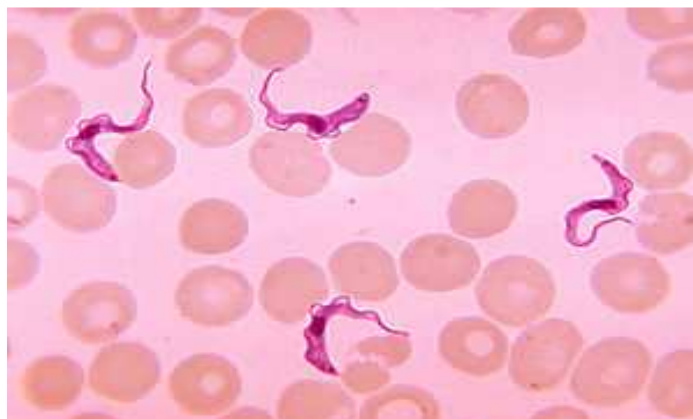
2.7.3. Struktura

T. cruzi je štíhlý bičíkovec (Obr. č. 9) o velikosti 15-20 nm, vlnitého tvaru těla, s jedním bičíkem, který tvoří podél těla undulující membránu. Bičíkatá forma se nazývá trypomastigot a vyskytuje se v krevním řečišti, kde se nemnoží a bezbičíkatá ovalná forma – asmatigot se vyskytuje uvnitř buněk různých tkání

(mozek, játra, srdce), kde se množí. Tento parazit nevytváří cesty (Bednář *et al.*, 1996).

Obr. č. 9. Snímek ze světelné mikroskopie krve, čtyři prvoci *Trypanosoma cruzi* (stádium vývoje - trypomastigot) mezi červenými krvinkami, převzato

z:http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trypanosoma_sp._PHIL_613_lores.jpg



2.7.4. Přenos

Parazit je primárně přenášen krví sajícím hmyzem - plošticemi (*Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans*), známými také jako „líbající ploštice (kissing bugs)“. V noci vylézají z úkrytu a sají krev na obličeji, v blízkosti rtů a víček. Chagasova nemoc může být dále šířena prostřednictvím krevní transfuze, transplantace orgánů, z matky na nenarozené dítě nebo konzumací kontaminovaných potravin nebo nápojů (Prata, 2001, Voelker, 2009).

2.7.5. Diagnostika

Sérologické testy na přítomnost protilátek proti *T. cruzi* jsou vhodné pro rychlý a levný průkaz infekce. Klasické testy, jako jsou nepřímý hemaglutinační test, nepřímý imunofluorescenční test a ELISA, jsou velmi často používány v zemích

s endemickým výskytem. Většina testů je založena na využití celé nebo semipurifikované antigenní frakce z *T. cruzi* (Luquetti, 2009).

Americký úřad pro kontrolu léčiv US FDA (United States Food and Drug Administration) mezi doporučené a schválené testy pro detekci protilátek proti *T. cruzi* řadí: stanovení chemiluminiscenční metodou od firmy Abbott (Abbott Prism Chagas) a enzymoimunoanalýzou od firmy ORTO (Orto cruzi ELISA Test System) (www.fda.gov).

V USA bylo zahájeno testování dárců krve na Chagasovu nemoc v roce 2007 a od té doby bylo zjištěno již 1.000 dárců s tímto onemocněním (www.fda.gov).

Metoda Western blot je využívána jako konfirmační metoda pro detekci protilátek proti *T. cruzi*, u které jsou detekovány tyto cílové antigeny: FP3, FP6, FP10 a TCF. Tento test ukázal, vysokou hladinu citlivosti a přesnosti (Kevin, 2007).

4. TEORETICKÁ ČÁST B: Legislativa

Uvádím zde pro porovnání legislativu několika zemí EU, jsou to převážně státy sousedící s ČR (Slovenskou republiku, Rakouskou republiku, Německou republiku, Polskou republiku, Spojené království Velké Británie a Severního Irsku a Francouzskou republiku) a Spojených států amerických.

4.1. Legislativa Evropské unie

K Evropské unii patří 27 členských států, které jsou povinni řídit se dle platné Direktivy 2002/98/EC Rady Evropského parlamentu ze dne 27. ledna 2003, kterou se stanoví standardy kvality a bezpečnosti pro odběr, vyšetření, zpracování, skladování a distribuci lidské krve a krevních derivátů.

Direktiva požaduje u dárců krve následující vyšetření známek infekce:

- HBV, metodou stanovení povrchového antigenu (HBsAg)
- HCV, metodou stanovení protilátek (anti-HCV)
- HIV-1/2, metodou stanovení protilátek (anti-HIV-1/2)
- další zkoušky mohou být vyžadovány pro specifické složky krve, dárce nebo podle epidemiologické situace (Direktiva Rady Evropského parlamentu, 2003)

4.2. Legislativa České republiky

Legislativa České republiky se řídí dle platného zákona Ministerstva zdravotnictví České republiky 143/2008 Sb. (vyhláška o krvi). Při každém odběru se provádí vyšetření diagnostických vzorků získaných od dárce krve zahrnující vyšetření k průkazu známek infekce:

- HBV, metodou stanovení povrchového antigenu (HBsAg)
- HCV, metodou stanovení protilátek (anti-HCV)
- HIV-1/2, metodou stanovení protilátek (anti-HIV-1/2) a antigenu p24
- syfilis, metodou stanovení protilátek proti *T. pallidum*

Podle epidemiologické situace a spektra vyráběných přípravků apod. může zařízení transfuzní služby rozšířit panel vyšetření o doplňkové testy (např. HCV-Ag, anti-HBc, anti-CMV aj.). V takovém případě musí být písemně stanoveno, v jakých případech se testování provádí a výsledek vyšetření musí být zvažován při propouštění vyšetřených transfuzních přípravků.

Pro povinná vyšetření infekčních onemocnění u dárců krve a jejích složek se používají diagnostika, která splňují požadavky pro příslušné zdravotnické prostředky a nesou označení CE (Sbírka zákonů ČR, 2008).

4.3. Legislativa Slovenské republiky

Dle platného zákona Slovenské republiky č.282/2006 nařizuje vláda pro dárce tkání a buněk na vyloučení infekce následující laboratorní vyšetření:

- HBV, metodou stanovení povrchového antigenu (HBsAg) a protilátek proti core antigenu (anti-HBc)
- HCV, metodou stanovení protilátek (anti-HCV)
- HIV-1/2, metodou stanovení protilátek (anti-HIV-1/2)
- syfilis, metodou stanovení protilátek proti *T. pallidum*
- HTLV-1, pokud dárce pochází z oblasti s vysokým výskytem viru, a nebo jehož sexuální partner, rodiče pochází z této oblasti (www.zbierka.sk)

4.4. Legislativa Polské republiky

Dle platného zákona Ministerstva zdravotnictví Polské republiky sbírka zákonů č. 79/691 ze dne 18. května 2005 musí být splněny podmínky pro zabezpečení jakosti tkání a buněk, vyšetřením krve a krevních derivátů od dárců na přítomnost infekčních původců:

- HBV, metodou stanovení povrchového antigenu (HBsAg) a vyšetření genomu HBV (NAT)
- HCV, metodou stanovení protilátek (anti-HCV) a vyšetření genomu HCV (NAT)
- HIV-1/2, metodou stanovení protilátek (anti-HIV-1/2) a vyšetření genomu HIV (NAT)
- syfilis, metodou stanovení protilátek proti *T. pallidum*
- HTLV-1, u dárce, který žije nebo pochází z oblasti s vysokým výskytem viru, nebo jejichž sexuální partneři nebo rodiče pocházejí z těchto oblastí (<http://isap.sejm.gov.pl/DetailsServlet?id=WDU20050790691>)

4.5. Legislativa Rakouské republiky

Dle vyhlášky č. 191 Ministerstva zdravotnictví, rodiny a mládeže Rakouské republiky, na základě zákona: Stanovení standardů pro využívání lidských buněk a tkání (Spolková sbírka zákonů I č. 49/2008), musí být provedeny u každého dárce buněk nebo tkání následující laboratorní testy:

- HBV, metodou stanovení povrchového antigenu (HBsAg) a protilátek proti core antigenu (anti-HBc)
- HCV, metodou stanovení protilátek (anti-HCV) a vyšetření genomu HCV (NAT)
- HIV-1/2, metodou stanovení protilátek (anti-HIV-1/2) a vyšetření genomu HIV-1 (NAT)
- syfilis, metodou stanovení protilátek proti *T. pallidum*
- detekce HTLV-I protilátek je prováděna u dárců, kteří žijí v oblastech s vysokým výskytem nebo jejichž sexuální partneři nebo rodiče pocházejí z těchto oblastí (www.ris.bka.gv.at)

4.6. Legislativa Německé republiky

Dle zákona o transfuzích 12 a 18, vydaných spolkovým ministerstvem spravedlnosti Německé republiky z roku 2005, je každý dárce krve vyšetřen na přítomnost infekce:

- HBV, metodou stanovení povrchového antigenu (HBsAg)
- HCV, metodou stanovení protilátek (anti-HCV) a vyšetření genomu HCV (NAT)
- HIV-1/2, metodou stanovení protilátek (anti-HIV-1/2) a vyšetření genomu HIV-1 (NAT)
- syfilis, metodou stanovení protilátek proti *T. pallidum* (www.bundesanzeiger.de)

4.7. Legislativa Spojeného království Velké Británie a Severního Irska

Dle nařízení č.50/2005-Pro bezpečnost a kvalitu krve, jsou dárce krve vyšetřeni na následující infekce:

- HBV, metodou stanovení povrchového antigenu (HBsAg)
- HCV, metodou stanovení protilátek (anti-HCV)
- HIV-1/2, metodou stanovení protilátek (anti-HIV-1/2)
- další zkoušky mohou být vyžadovány pro specifické složky krve, dárce nebo podle epidemiologické situace

(www.mhra.gov.uk/Howweregulate/Blood/index.htm)

4.8. Legislativa Francouzské republiky

Z úředního věstníku Francouzské republiky z 26.února 1995, stránka 3061. Vyhláška č. 95-195 ze dne 16. února 1995 vyplývá, že se provádí následující biologické zkoušky pro screening dárců krve:

- HBV, metodou stanovení povrchového antigenu (HBsAg) a protilátek proti core antigenu (anti-HBc)
- HCV, metodou stanovení protilátek (anti-HCV)
- HIV-1/2, metodou stanovení protilátek (anti-HIV-1/2)
- syfilis, metodou stanovení protilátek proti *T. pallidum*
- HTLV-1/2, metodou stanovení protilátek (anti-HTLV-I/II)

(<http://www.sante.gouv.fr/pdf/95-195.pdf>)

4.9. Legislativa Spojených států amerických

V USA jsou transfuzní stanice povinné se řídit nařízením Ministerstva zdravotnictví a sociálních služeb a Amerického úřadu pro kontrolu léčiv US FDA (United States Food and Drug Administration), federálním zákonem 21 CFR Sec. 610,40. Určující požadavky na testy průkazu přenosných původců nemoci jsou následující:

- HBV, metodou stanovení povrchového antigenu (HBsAg) a protilátek proti core antigenu (anti-HBc)
- HCV, metodou stanovení protilátek (anti-HCV) a vyšetření genomu HCV (NAT)
- HIV-1/2, metodou stanovení protilátek (anti-HIV-1/2) a vyšetření genomu HIV-1/2 (NAT)
- syfilis, metodou stanovení protilátek proti *T. pallidum*
- HTLV-1/2, metodou stanovení protilátek (anti-HTLV-I/II)

Nezávazně je doporučováno vyšetřovat dárce krve na:

- WNV, metodou vyšetření genomu (NAT)
- Chagasova nemoc, metodou stanovení protilátek proti *T. cruzi*

Vzorek z každého odběru určený pro alogenní použití musí být testován licencovanými testy dle FDA

(<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/TissueSafety/ucm095440.htm>).

5. Diskuze

I přesto, že transfuze krve je v dnešní době mnohem bezpečnější než dříve, stále hrozí nebezpečí přenosu infekce, pokud nebudou dodržovány legislativní předpisy.

Průkaz infekčního onemocnění dárců a volba vyšetřovacích metod by měla vycházet z epidemiologické situace, kinetiky rozvoje markerů dané infekce a variability / stability detekovaných markerů. V oblastech s vysokou prevalencí sledovaných infekčních onemocnění se zvyšuje význam přímého průkazu infekce a zkracování infekčního okna (Turek, 2009).

Mezi státy EU díky Direktivě Rady Evropského parlamentu 2002/98/EC se vyšetřování dárců příliš neliší. Transfuzní oddělení na územích EU jsou povinni vyšetřovat následující infekce: Hepatitidu B (průkaz HBsAg), Hepatitidu C (průkaz anti – HCV), HIV 1/2 (průkaz anti - HIV 1/2). Další zkoušky mohou být vyžadovány pro specifické složky nebo dárce nebo epidemiologické situace (Direktiva Rady Evropského parlamentu, 2003).

Syfilis patří mezi první infekce vyšetřované pro účely transfuzního lékařství. I přesto, že Direktiva EU nevyžaduje detekci syfilis, řada zemí s ohledem na zvýšený výskyt tohoto onemocnění, díky migraci, pokračuje ve screeningu dárců krve. Je vyšetřován ve všech zde uvedených státech, kromě Spojeného království Velké Británie a Severního Irska.

Detekci protilátek proti HTLV–1/2 má uvedenou v legislativě Francouzská republika a USA, v dalších státech uvedených v této diplomové práci je toto vyšetření požadováno pouze u osob pocházejících nebo dlouhodobě žijících v endemických oblastech výskytu. Prvně byl screening dárců krve zaveden v Japonsku, od prosince roku 1988 se provádí také v USA (Manns *et al.*, 1999).

S nástupem nových, citlivějších vyšetřovacích metod, jako je přímá detekce nukleové kyseliny (NAT) se objevuje povinnost vyšetřovat některá infekční agens touto metodou. Příkladem je Německá, Rakouská a Polská republika, kde se analyzují vzorky dárců NAT metodou při průkazu infekce vyvolané HBV, HCV a

HIV-1. V USA je vyšetření na detekci nukleové kyseliny legislativně dáno při průkazu infekce vyvolané HCV, HIV-1/2 a WNV. Infekční choroby vyvolané těmito původci jsou detekovány citlivými testy především proto, že touto metodou dochází ke zkrácení tzv. diagnostického okna.

Od roku 2008 je v USA schválen nový diagnostický test: TaqScreen MPX (firma Roche). Jde o kvalitativní multiplexní test, který umožňuje screening a současnou detekci HIV-1 RNA skupin M a O, HIV-2 RNA, HCV RNA a HBV DNA ve směsných nebo jednotlivých dárcovských vzorcích plazmy. Test TaqScreen MPX používá obecnou techniku přípravy nukleové kyseliny na přístroji COBAS AmpliPrep. RNA HIV-1 skupin M a O, HIV-2 RNA, HCV RNA a HBV DNA jsou amplifikovány a detekovány pomocí automatizované, v reálném čase probíhající polymerázové řetězové reakce (PCR) na analyzáru COBAS TaqMan.

Jak je zmíněno v kapitole 2.2.5. u hepatitidy typu B je v současné době dostačující prokazovat australský antigen, neboť standardní vyšetření HBV DNA nám jen o málo sníží diagnostické okno pro tuto infekci. Řada zemí (Slovensko, Rakousko, Francie a USA) rozšiřuje tento screening o detekci protilátek proti core antigenu (anti-HBc), ke zjištění chronických HBV nosičů s velmi nízkou virovou zátěží (Offergeld, 2005). Screening dárců krve na Chagasovu chorobu a WNV zůstává prozatím rutinně vyšetřován v USA, i když tato vyšetření nejsou ze zákona povinná. Na tyto choroby je ve státech EU myšleno při předodběrovém vyšetření, kdy je dárce povinen uvést pravdivé informace o zahraničních cestách a pobytu v epidemických oblastech.

6. Závěr

Z uvedených údajů vyplývá, že země EU a USA dodržují předepsané legislativní normy, které zajišťují bezpečnost transfuzí a krevních derivátů.

Vyšetřovací panel transfuzní medicíny se neustále rozšiřuje o nové infekční původce onemocnění. Od roku 1980 došlo k objevu: HTLV, HIV a HCV. V posledních desetiletích dochází k rozšíření WNV infekce a Chagasovy choroby v USA a jejich šíření na další kontinenty.

Donedávna byl test na průkaz genomu infekčních agens používán převážně jako konfirmační test. Nyní bývá tento test používán i pro rutinní vyšetření dárců krve a to v USA, Polsku, Německu a Rakousku.

Současná léčba HIV, hepatitid typu B a C, syfilis atd., je časově a finančně nákladná. A proto včasná a správná diagnostika případných infekčních agens ušetří náklady na léčbu a zabrání dalšímu šíření infekce.

7. Literatura

- *Abbott Diagnostics Česká republika: Nové produkty: Rok 2009 : Imunoanalýza: ARCHITECT HCV Ag* [online]. Praha: Abbott Diagnostics, c2010. [cit. 2010-04-15]. Dostupné z: <<http://www.abbottdiagnostics.cz/nove-produkty/rok-2009/imunoanaliza/architect-hcv-ag.html>>.
- ALLAN, J. S., et al. Major glycoprotein antigens that induce antibodies in AIDS patients are encoded by HTLV-III. *Science*, May 1985, vol. 228, iss. 4703, s. 1091-1094.
- BALAKRISHNAN, S., et al. Alternative paths in HIV-1 targeted human signal transduction pathways. *BMC genomics*, Dec 2009, vol. 10, suppl. 3, s. S30.
- BARRE-SINOUSSE, F., et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, May 1983, vol. 220, iss. 4599, s. 868–871.
- BENEŠ, J., et al. *Infekční lékařství*. Praha: Galén, 2009. Galén, 651 s. ISBN 978-80-7262-644-1.
- BEDNÁŘ, M., et al. *Lékařská mikrobiologie*. Praha: Marvil, 1996. 558 s.
- BISSESSOR, M., CHEN, M. Syphilis, the great mimicker, is back [online]. *Australian family physician*, Jun 2009, vol. 38, no. 6, s. 384-387. [cit. 2010-04-15]. Dostupné z: <<http://www.racgp.org.au/afp/200906/200906bissessor.pdf>>.
- BOXUS, M., WILLEMS, L. Mechanisms of HTLV-1 persistence and transformation [online]. *British journal of cancer*, Nov 2009, vol. 101, iss. 9, s. 1497-1501. [cit. 2010-01-18]. Dostupné z: <<http://www.nature.com/bjc/journal/v101/n9/full/6605345a.html>>.
- BRŮČKOVÁ, M. Detekce infekce HIV u dárců krve. *Transfúze a dnes*, 2001, roč. 7, č. 1, s. 15-18. ISSN 1212-9887.

- *Bundesanzeiger Verlag* [online]. Köln : Bundesanzeiger Verlagsgesellschaft. [cit. 2010-03-10]. Dostupné z: <www.bundesanzeiger.de>.
- *Bundeskanzleramt – Rechtsinformationssystem* [online]. Wien: Bundeskanzleramt Österreich, c2010. [cit. 2010-03-15]. Dostupné z: <www.ris.bka.gv.at>.
- BUSCH, M. P., KLEINMAN, S. H., NEMO, G. J. *Current and emerging infectious risks of blood transfusions*. *JAMA*, Feb 2003, vol. 289, iss. 8, s. 959-962.
- *Centers for disease control and prevention: Fact sheets : Virology: Human Immunodeficiency Virus Type 2* [online]. Oct 1998. Poslední aktualizace 8. 3. 2007. [cit. 2010-04-01]. Dostupné z: <<http://www.cdc.gov/hiv/resources/factsheets/hiv2.htm>>
- COFFIN, J., et al. Human immunodeficiency viruses. *Science*, May 1986, vol. 232, iss. 4751, s. 697.
- CRAVEN, R. B., ROHRIG, J. T. West Nile virus. *JAMA*, Aug 2001, vol. 286, iss. 6, s. 651-653.
- Current Trends Licensure of Screening Tests for Antibody to Human T-Lymphotropic Virus Type I [online]. *MMWR : Morbidity and mortality weekly report*, Dec 1988, vol. 37, iss. 48, s. 736-740, 745-747 [cit. 2010-03-25]. Dostupné z: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001311.htm>>.
- *Database resources of the National Center for Biotechnology Information: Taxonomy browser* [online]. Bethesda: The National Center for Biotechnology Information, Oct 2008. [cit. 2010-05-15]. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Root>>
- DAUBY, N., et al. Maternal infection with *Trypanosoma cruzi* and congenital Chagas disease induce a trend to a type 1 polarization of infant immune responses to vaccines. *PLoS neglected tropical diseases*, Dec 2009, vol. 3, iss. 12, s. e571.

- DAVIS, K. C. Acquired immunodeficiency syndrome in a patient with hemophilia. *Annals of internal medicine*, Mar 1983, vol. 98, iss. 3, s. 284-6.
- Directive 2002/98/EC of the European Parliament and of the Council of 27 January 2003 setting standards of quality and safety for the collection, testing, processing, storage and distribution of human blood and blood components and amending Directive 2001/83/EC [online]. *Official Journal of the European Union*, Feb 2003, vol. 46, L033, s. 30-40. [cit. 2010-04-01]. Dostupné z: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:033:0030:0040:EN:PDF>>
- *Dz. U. 2005 nr 79 poz. 691 : rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 18 kwietnia 2005 r. w sprawie warunków pobierania krwi od kandydatów na dawców krwi i dawców krwi* [online]. Warszawa: Ministerstwo Zdrowia, 2005. S. 5284-5291. [cit. 2010-04-15]. Dostupné z: <<http://isap.sejm.gov.pl/DetailsServlet?id=WDU20050790691>>
- *Elektronická Zbierka zákonov* [online]. Bratislava: IURA EDITION, c1999-2010. [cit. 2010-04-13]. Dostupné z: <www.zbierka.sk>..
- Epidemiologic notes and reports persistent, generalized lymphadenopathy among homosexual males [online]. *MMWR : Morbidity and mortality weekly report*, May 1982, vol. 31, iss. 19, s. 249-251. [cit. 2010-03-21]. Dostupné z: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001096.htm>>
- FLETCHER, T. M., et al. Nuclear import and cell cycle arrest functions of the HIV-1 Vpr protein are encoded by two separate genes in HIV-2/SIV(SM) [online]. *The EMBO journal*, Nov 1996, vol. 15, iss. 22, s. 6155-6165. [cit. 2010-06-01]. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC452436/pdf/emboj00022-0151.pdf>>
- FORBI, J. C., et al. Epidemic history and evolutionary dynamics of hepatitis B virus infection in two remote communities in rural Nigeria [online]. *PLoS One*. 2010, vol. 5, iss. 7, s. 11615-. [cit. 2010-08-01]. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2906510/pdf/pone.0011615.pdf>>

- GANEM, D., SCHNEIDER, R. J. Hepadnaviridae : the viruses and their replication. In KNIPE, D. M, HOWLEY, P. M. *Fields virology*. 4th ed. Vol. 2. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, c2001. S. 1581 – 3087. ISBN 0-7817-1832-5. S. 2923-2969.
- *Guidance for industry : notifying FDA of fatalities related to blood collection or transfusion : final guidance* [online]. Silver Spring : Food and Drug Administration, 2003. Poslední aktualizace 16. 9. 2009. [cit. 2010-07-15]. Dostupné z:
<<http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm062897.pdf>>.
- HAYES, E. B., et al. Epidemiology and Transmission Dynamics of West Nile Virus Disease [online]. *Emerging infectious diseases*, Aug 2005, vol. 11, iss. 8, s. 1167-73. [cit. 2010-01-25]. Dostupné z:
<<http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol11no08/pdfs/05-0289a.pdf>>.
- HOLLINGER, F. B., LIANG, T. J. Hepatitis B virus. In KNIPE, D. M, HOWLEY, P. M. *Fields virology*. 4th ed. Vol. 2. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, c2001. S. 1581 – 3087. ISBN 0-7817-1832-5. S. 2971–3036.
- HUSA, P. *Virové hepatitidy*. Praha: Galén, 2005. 247 s. ISBN 80-7262-304-4.
- CHOO, Q. L., et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis geonome. *Science*, Apr 1989, vol. 244, iss. 4902, s. 359-62.
- Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men - New York City and California [online]. *MMWR : Morbidity and mortality weekly report*, Jul 1981, vol. 30, iss. 25, s. 305-308. [cit. 2010-04-28]. Dostupné z:
<<http://www.cdc.gov/hiv/resources/reports/mmwr/pdf/mmwr04jul81.pdf>>
- KEVIN, Y., et al. Immunoblot assay using recombinant antigens as a supplemental test to confirm the presence of antibodies to trypanosoma

- cruzi. *Clinical and vaccine immunology*, Apr. 2007, vol. 14, no. 4, s. 355–361.
- KHER, U. A name for the plague : 80 days that changed the world: July 27, 1982 [online]. *Time: New York*, Mar 2003, vol. 161, iss. 13, s. A64. [cit. 2010-04-01]. Dostupné z: <<http://www.time.com/time/80days/820727.html>>
 - KIM, J., et al. Identification of performance problems in a commercial human immunodeficiency virus type 1 enzyme immunoassay by multiuser external quality control monitoring and real-time data analysis. *Journal of clinical microbiology*, Oct 2009, vol. 47, iss. 10), s. 3114-20.
 - KRAMVIS, A., KEW, M., FRANÇOIS, G. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine*, Mar 2005, vol. 23, iss. 19, s. 2409-2423.
 - KREJSEK, J., KOPECKÝ, O. *Klinická imunologie*. Hradec Králové: Nucleus HK, 2004. 941 s. ISBN 80-86225-50-X.
 - LANCIOTTI, R. S., et al. Rapid detection of west nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay [online]. *Journal of clinical microbiology*, Nov 2000, vol. 38, iss. 11, s. 4066-71. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC87542/pdf/jm004066.pdf>>.
 - LEQUIN, R. M. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical chemistry*, Dec 2005, vol. 51, iss. 12, s. 2415-8.
 - LEVY, J. A., et al. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science*, Aug 1984, vol. 225, iss. 4664, s. 840-2.
 - LIANG, T. J. Hepatitis B: the virus and disease [online]. *Hepatology*, May 2009, vol. 49, iss. 5 Suppl., s. S13-S21.
 - LUQUETTI, A. O., et al. Performance levels of four Latin American laboratories for the serodiagnosis of Chagas disease in Mexican sera samples. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Aug 2009, vol. 104, iss. 5, s. 797-800.

- MAGNIUS, L. O., NORDER, H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology*, 1995, vol. 38, iss. 1-2, s. 24-34.
- MANNS, A., et al. Human T-lymphotropic virus type I infection. *Lancet*, Jun 1999, vol. 353, iss. 9168, s. 1951-1958.
- MARQUEZ, C., ZETOLA, N., KLAUSNER, J. D. HIV testing : an update [online]. *Medical Laboratory Observer*, Feb 2008, vol. 40, iss. 2, s. 12-21. [cit. 2010-01-25]. Dostupné z: <<http://proquest.umi.com>>.
- MARR, J. S., CALISHER, Ch. H. Alexander the Great and West Nile virus encephalitis [online]. *Emerging infectious diseases*, Dec 2003, vol. 9, iss. 12, s. 1599-1603. [cit. 2010-01-25]. Dostupné z: <<http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol9no12/03-0288.htm>>.
- MARTÍN-DAVILA, P., et al. Transmission of tropical and geographically restricted infections during solid-organ transplantation. *Clinical microbiology reviews*, Jan 2008, vol. 21, no. 1, s. 60-96.
- MASUR, H., et al. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *New England journal of medicine*, Dec 1981, vol. 305, iss. 24, s. 1431-1438.
- MAYS, S., CRANE-KRAMER, G., BAYLISS, A. Two probable cases of treponemal disease of Medieval date from England. *American journal of physical anthropology*, Feb 2003, vol. 120, iss. 2, s. 133-143.
- *Medical microbiology : general concepts study guide* [online]. 4. ed. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. 276 s. ISBN 0-9631172-1-1. [cit. 2010-06-05]. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mmed>>.
- *Medicines and healthcare products regulatory agency : How we regulate : Blood* [online]. London: MHRA, c2010. Aktualizováno 6. 5. 2010. [cit. 2010-06-15]. Dostupné z: <<http://www.mhra.gov.uk/Howweregulate/Blood/index.htm>>.

- MORADPOUR, D., et al. Hepatitis C: an update. *Swiss medical weekly : official journal of the Swiss society of infectious diseases, the Swiss society of internal medicine, the Swiss society of pneumology*, Jun 2001, vol. 131, iss. 21-22, s. 291-8.
- NARANJO, P. On the American Indian origin of syphilis : fallacies and errors. *Allergy proceedings : the official journal of regional and state allergy societies*, Mar-Apr 1994, vol. 15, no. 2, s. 89-99.
- OFFERGELD, R., et al. Human immunodeficiency virus, hepatitis C and hepatitis B infections among blood donors in Germany 2000-2002 : risk of virus transmission and the impact of nucleic acid amplification testing [online]. *Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles*, Feb 2005, vol. 10, iss. 2, s. 8-11. [cit. 2010-04-08].
Dostupné z:
<<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=522>>.
- Pneumocystis pneumonia : Los Angeles [online]. *MMWR : Morbidity and mortality weekly report*, Jun 1981, vol. 30, iss. 21, s. 1-3. [cit. 2010-03-01].
Dostupné z: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/june_5.htm>
- POIESZ, B. J., et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma [online]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Dec 1980, vol. 77, iss. 12, s. 7415-7419. [cit. 2010-03-01]. Dostupné z:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC350514/pdf/pnas00499-0477.pdf>>.
- PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet infectious diseases*, Sep 2001, vol. 1, iss. 2, s. 92-100.
- QIU, P., et al. HCV genotyping using statistical classification approach. *Journal of biomedical science*, Jul 2009, vol. 8, iss. 16, s. 62.
- Relatif aux analyses biologiques et tests de dépistage des maladies transmissibles effectués sur les prélèvements de sang et de ses composants

- [online]. *Journal officiel de la Republique Francoise*, 1995, s. 3061. [cit. 2010-03-11]. Dostupné z: <<http://www.sante.gouv.fr/pdf/95-195.pdf>>.
- *Retroviruses* [online]. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. 843 s. ISBN 0-87969-571-4. [cit. 2010-04-15]. Dostupné z: <http://books.google.cz/books?id=Awcmfx8EaOAC&dq=retroviruses+coffin&printsec=frontcover&source=bn&hl=cs&ei=krRXTKLvA4eNOKyt_fMI&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=4&ved=0CCsQ6AEwAw#v=onepage&q&f=false>.
 - ROBEY, W. G., et al. Characterization of envelope and core structural gene products of HTLV-III with sera from AIDS patients. *Science*, May 1985, vol. 228, iss. 4699, s. 593-595.
 - RYAN, B., et al. Inhibitor-induced structural change in the HCV IRES domain IIa RNA [online]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Apr 2010, vol. 107, iss. 16, s. 7263–7268. [cit. 2010-04-08]. Dostupné z: <<http://www.pnas.org/content/107/16/7263.full.pdf+html>>.
 - SHEPARD, C. W., et al. Hepatitis B virus infection : epidemiology and vaccination [online]. *Epidemiologic reviews*, 2006, vol. 28, iss. 1, s. 112-125. [cit. 2010-03-01]. Dostupné z: <<http://epirev.oxfordjournals.org/cgi/reprint/28/1/112>>.
 - SHI, P. Y., et al. High-throughput detection of West Nile virus RNA [online]. *Journal of clinical microbiology*, Apr 2001, vol. 39, iss. 4, s. 1264-71. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC87922/pdf/jm001264.pdf>>.
 - SCHAPACHNIK, E., et al. Dr. Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas (1879-1934) : a giant of the Third World. *Cardiology journal*, 2009, vol. 16, iss. 6, s. 592-593.
 - SVOBODA, J. *Imunologie v klinické praxi. Sv. 1, HIV onemocnění a AIDS jako modely postižení imunitního systému*. Praha: Marvil, 1996. 435 s.

- TUREK, P. Vyšetřování infekčních markerů v transfuzní službě. *Transfuze a hematologie dnes: časopis Společnosti pro transfuzní lékařství a Hematologické společnosti*, 2009, roč. 15, suppl. 3, s. 17-19.
- U. S. Food and Drug Administration (FDA) [online]. Silver Spring, U.S. Food and Drug Administration. Poslední aktualizace 17. 6. 2010. [cit. 2010-06-18]. Dostupné z: <<http://www.fda.gov/>>.
- U. S. Food and Drug Administration (FDA) : Vaccines, Blood & Biologics : Safety & Availability (Biologics) : Tissue Safety & Availability : Testing HCT/P donors for relevant communicable disease agents and diseases [online]. Poslední aktualizace 17. 6. 2010. [cit. 2010-06-18]. Dostupné z: <<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/TissueSafety/ucm095440.htm>>.
- VERONESE, F. D., et al. Characterization of gp41 as the transmembrane protein coded by the HTLVIII/LAV envelope gene. *Science*, Sep 1985, vol. 229, iss. 4720, s. 1402-1405.
- VOELKER, R. A century after Chagas disease discovery, hurdles to tackling the infection remain. *JAMA*, Sep 2009, vol. 302, iss. 10, s. 1045-7.
- Vyhláška č. 143/2008 Sb. ze dne 15. dubna 2008 o stanovení bližších požadavků pro zajištění jakosti a bezpečnosti lidské krve a jejích složek (vyhláška o lidské krvi). In *Sbírka zákonů České republiky*, 2008, částka 45, s. 1803-1838.
- *West Nile virus* [online]. Reston : National Biological Information Infrastructure [cit. 2010-06-24]. Dostupné z: <<http://westnilevirus.nbi.gov/>>.
- WIWANITKIT, V. A cost-utility analysis of Treponema pallidum haemagglutination (TPHA) testing for syphilis screening of blood donors : is the TPHA test useful for syphilis screening in a blood centre? [online]. *Blood transfusion*, Jan 2009, vol. 7, iss. 1, s. 65–66. [cit. 2010-06-15]. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2652238/pdf/blt-07-065.pdf>>.

- ZIMA, T., et al. *Laboratorní diagnostika*. Praha: Galén, 2007. 728 s. ISBN 978-80-7262-372.
- ZUNT, J. R., et al. HTLV-2 infection in injection drug users in King County, Washington [online]. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 2006, vol. 38, iss. 8, s. 654-663. [cit. 2010-03-01]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2683846/pdf/nihms109758.pdf>

Obrázky:

1. www.lfhk.cuni.cz/ukia/vyuka/aids.pps, datováno k 30.4.2010
2. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hepatitis_B_virus_v2.png, datováno k 25.2.2010
3. <http://inf3.lf1.cuni.cz/~hrozs/vhakupch1.htm>, datováno k 3.3.2010
4. <http://www.thenakedscientists.com/HTML/content/interviews/interview/1149/>, datováno k 14.2.2010
5. <http://www.abbottdiagnostics.cz/nove-produkty/rok-2009/imunoanalyza/architect-hcv-ag.html><http://udel.edu/~edcwelch/HTLV.html>, datováno k 15.3.2010
6. <http://udel.edu/~edcwelch/HTLV.html>, datováno k 30.4.2010
7. www.news-medical.net/health/West-Nile-Virus.aspx, datováno k 11.8.2010
8. www.jci.org/articles/view/12484/figure/1, datováno k 5.8.2010
9. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trypanosoma_sp._PHIL_613_lores.jpg, datováno k 10.8.2010