

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
**katedra biologických a lékařských věd**

**Bakalářská práce**  
**HIV – vývoj diagnostiky**

**Vedoucí bakalářské práce: MUDr. Pavla Paterová**

Hradec Králové, 2013

Martina Kořínková

## **Poděkování**

Děkuji MUDr. Pavle Paterové za cenné připomínky při psaní bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala těm, kteří mě při psaní této práce podpořili.

*Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, řádně cituji. Práce nebyla využita pro získání jiného kvalifikačního titulu.*

V Hradci Králové, ..... 2013

.....

.

# OBSAH

ABSTRAKT .....	7
ABSTRACT .....	8
ÚVOD .....	9
ZADÁNÍ PRÁCE- CÍL PRÁCE .....	10
1. Virus HIV .....	11
1.1. Historie .....	12
1.2. Přenos HIV infekce .....	14
1.3. Onemocnění .....	15
1.3.1. Klinický obraz .....	15
1.3.1.1. Asymptomatické stádium (klinická kategorie A).....	16
1.3.1.2. Časně symptomatické stádium (klinická kategorie B) .....	17
1.3.1.3. Pozdní symptomatické stádium (klinická kategorie C, AIDS stádium).....	17
1.3.1.4. Laboratorní stádia.....	18
1.3.2. Léčba .....	18
1.4. Současná epidemiologická situace .....	20
1.4.1. Současná epidemiologická situace ve světě .....	20
1.4.2. Současná epidemiologická situace v ČR.....	22
2. Epidemiologická opatření .....	26
2.1. Preventivní opatření .....	26
2.1.1. Bezpečný sex .....	26
2.1.2. Osoby užívající návykové látky .....	27
2.1.3. Těhotenství .....	27
2.1.4. Parenterální přenos .....	27
2.1.5. Postexpoziční profylaxe .....	27
2.2. Represivní opatření .....	28

3. Vývoj diagnostiky HIV .....	29
3.1. 80. léta .....	29
3.2. 90. léta .....	30
3.3. Vývoj po roce 2000 .....	31
3.4. Vývoj v České republice .....	32
4. Laboratorní diagnostika.....	34
4.1 Odběr materiálu pro vyšetření.....	34
4.2. Přímá diagnostika.....	35
4.2.1. Kultivační metody .....	35
4.2.2. Detekce antigenu p24 .....	36
4.2.3 Elektronová mikroskopie .....	36
4.3. Průkaz virového genomu.....	37
4.3.1. Plasma Viral Load.....	37
4.3.2. Amplifikace RNA .....	37
4.4. Nepřímá diagnostika .....	37
4.4.1. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) .....	38
4.4.2 Imunofluorescenční test .....	39
4.4.3. Western Blotting .....	39
4.4.4 Virus neutralizační test.....	40
4.4.5. Rychlé testovací soupravy a domácí sady.....	41
4.5. Interpretace sérologických nálezů .....	42
ZÁVĚR.....	44
SEZNAM TABULEK.....	45
SEZNAM OBRÁZKŮ .....	46
SEZNAM GRAFŮ .....	46
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A DALŠÍCH ZDROJŮ .....	47
Literatura .....	47

Internetové zdroje.....	47
Prameny.....	49

## **ABSTRAKT**

**Autor:** Martina Kořínková

**Název:** HIV- vývoj diagnostiky

Bakalářská práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

**Studijní obor:** Zdravotnická bioanalytika, zdravotní laborant

**Cíl práce:** Sepsat informace o viru HIV od jeho objevu přes klinický obraz, léčbu, metody účinné prevence po metody laboratorní diagnostiky a zřehlednění jejího vývoje.

**Hlavní poznatky:** Tato práce se zabývá virem HIV, který byl objeven v osmdesátých letech 20. století a způsobuje onemocnění AIDS. Onemocnění AIDS zůstává nevyléčitelné, i přes veškerou snahu vědeckých týmů. Díky moderním lékům je život s infekcí HIV/AIDS komfortnějším. Počet případů infekce HIV každý rok narůstá jak v České republice, tak ve světě. Nejúčinnějším bojem proti této infekci jsou stále preventivní a represivní epidemiologická opatření. Poměrně brzy po objevení viru se našla specifická laboratorní diagnostika. Testy ELISA jsou stále centrální doménou této diagnostiky, i přesto že během let prošly několika úpravami. Pro diagnózu onemocnění je důležitá přímá a nepřímá laboratorní diagnostika, metod nepřímé diagnostiky, založených na detekci protilátek, se využívá nejvíce. Hlavními metodami v laboratorní diagnostice HIV jsou metody ELISA, Western Blotting, zjištění virové nálože v organismu a molekulárně – biologické metody.

**Závěry:** Laboratorní diagnostika od objevu viru HIV výrazně pokročila, infekci HIV lze diagnostikovat dříve a rychleji. I přes výrazné pokroky moderní vědy se nedá infekce virem HIV vyléčit. Pomocí nejnovějších léků můžeme její průběh zpomalit a zlepšit život nakažených. I přes veškerá epidemiologická opatření počet případů neustále stoupá.

**Klíčová slova:** AIDS, HIV, epidemiologie HIV, klinický obraz HIV, prevence HIV, léčba HIV, vývoj diagnostiky HIV, laboratorní diagnostika HIV, ELISA, Western blotting

## **ABSTRACT**

**Author:** Martina Kořínková

**Title:** HIV – development of diagnostics

Bachelor's thesis

The Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

**Field of Study:** Healthcare Bioanalytics, medical laboratory technician

**Background:** The main objective is to write information about HIV since its discovery through the clinical picture, treatment, effective prevention methods, methods of laboratory diagnosis and clarification of its development.

**Main findings:** This work deals with the HIV virus, which was discovered in the eighties of the 20th century and causes AIDS. AIDS remains incurable, despite all the efforts of research teams. Thanks to modern medicines is life with HIV / AIDS more comfortable. The number of cases of HIV infection in Czech Republic and in the world is growing each year. The most effective fight against this infection is still epidemiological preventive and repressive measures. Relatively soon after the discovery of the virus specific laboratory diagnostics has been found. ELISA tests are becoming central domain of the diagnosis, even though over the years has undergone several modifications. For the diagnosis of the disease is important direct and indirect laboratory diagnostics, indirect methods of diagnosis, based on the detection of antibodies, which is used the most. The main methods in the laboratory diagnosis of HIV are ELISA, Western Blotting, Plasma viral load and molecular - biological methods.

**Conclusions:** Laboratory diagnostics since the discovery of HIV has advanced significantly, HIV infection can be diagnosed earlier and faster. Despite significant advances in modern science HIV infection can't be cured. Using the latest drugs we can slow its progression and improve the lives of the infected. Despite all epidemiological measures the number of cases continues to rise.

**Key words:** AIDS, HIV, epidemiology of HIV, clinical picture of HIV, HIV prevention, HIV treatment, development of HIV diagnostics, laboratory diagnostics of HIV, ELISA, Western blotting



## ÚVOD

Je tomu již více než třicet let, kdy se ve světě objevilo nové a do té doby neznámé infekční onemocnění, které bylo nazváno AIDS. Během několika prvních let bylo zjištěno, že tuto nemoc způsobuje retrovirus, později nazván HIV. Jedná se o první pandemii, jež je způsobena retroviry a po třiceti letech od svého objevení stále nebyl nalezen lék na její úplné vyléčení.

Práce je dělena do čtyř kapitol. První kapitola pojednává o samotném viru HIV, historii jeho objevu, přenosu nákazy, klinickém obraze onemocnění, léčbě a epidemiologické situaci u nás a ve světě. Jsou zde shrnuty informace, které jsou o viru HIV dosud známé. Též jsou zde zpřehledněny informace o epidemiologické situaci v ČR a ve světě.

Druhá kapitola obsahuje epidemiologická opatření pro boj s HIV/AIDS. Tato opatření jsou velmi důležitá, protože představují jednu z hlavních zbraní v boji proti HIV. Jedná se zejména o preventivní opatření, jako je bezpečný sex nebo kontrola krevních konzerv a derivátů, ale i o represivní opatření, jako například hlášení výsledků, epidemiologická šetření v místě nákazy a izolace nakažených jedinců.

Ve třetí kapitole je uveden vývoj diagnostiky HIV, historie imunoenzymatických a dalších testů. V druhé části této kapitoly je přiblížen vývoj diagnostiky v České republice, a to především založení Národní referenční laboratoře pro AIDS a nelehké první krůčky tohoto zařízení.

Poslední kapitola pojednává o přímé a nepřímé laboratorní diagnostice, která je nepostradatelná pro diagnózu tohoto onemocnění. Uveden je zde i průkaz virového genomu, rychlé diagnostické testy, které jsou použity pro terénní pracovníky. Pro diagnostiku je důležitý také správný odběr biologického materiálu na vyšetření a jeho transport. Pro diagnózu a další léčebný a epidemiologický postup je zásadní správné hodnocení výsledků.

## **ZADÁNÍ PRÁCE - CÍL PRÁCE**

Cílem této práce je sepsání informací o viru HIV od jeho objevení, přes klinický obraz, metody účinné prevence, současnou epidemiologickou situaci v České republice i ve světě, léčbu, zpřehlednění vývoje laboratorní diagnostiky infekce HIV, až po metody laboratorní diagnostiky infekce HIV.

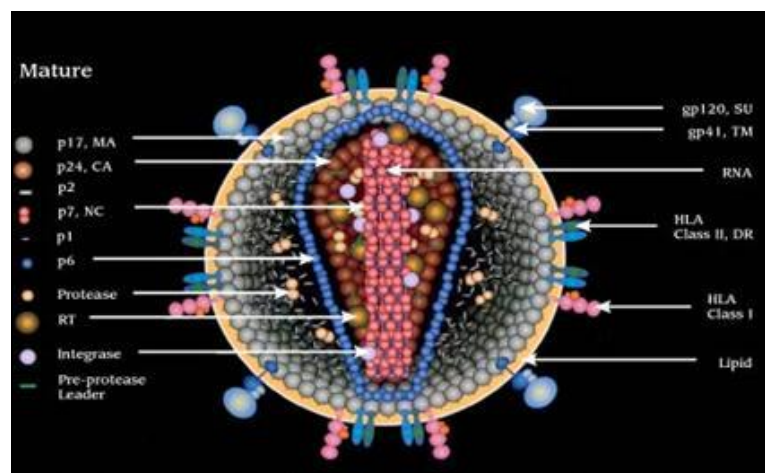
## 1. Virus HIV

Virus HIV (human immunodeficiency virus) patří do rodiny lidských retrovirů. Jeho genetická informace je zapsána v RNA a obsahuje také reverzní transkriptázu - enzym, který umožňuje přepsání genetické informace z RNA do DNA.

Virová částice je kulovitého charakteru o průměru 110 nm s kónickým jádrem a fosfolipidovou membránou odvozenou od membrány infikované buňky. Jádro obsahuje 9 genů, které kódují nejméně 15 virových proteinů (Beneš et al., 2009).

Ve fosfolipidové membráně virionu jsou ukotveny povrchový glykoprotein gp 120, který napomáhá přichycení virionu na hostitelskou buňku, a transmembránový glykoprotein gp 41 důležitý pro buněčnou fúzi. Mezi fosfolipidovou

vrstvou a jaderným obalem leží virová matrix tvořená vrstvou proteinu p 17. Jaderný obal - kapsida je tvořen proteinem p 24. Virová RNA je obalena nukleoproteinem p 7. Pro přepis genetické informace jsou důležité také enzymy reverzní transkriptáza, protéza, ribonukleáza a integráza (HIV structure, [online]).



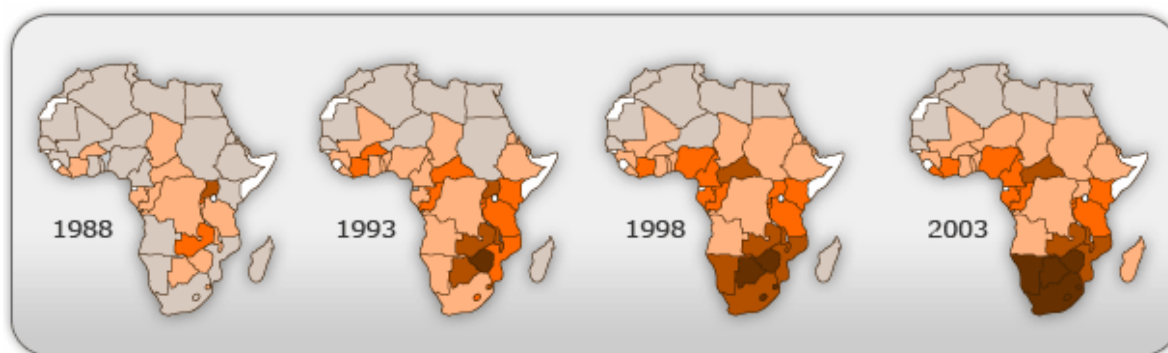
Obrázek 1 - Zralý virion HIV

(Dostupné z: <https://www.aidsreagent.org/images/postera.jpg>)

Byly objeveny dva typy lidského viru imunitní nedostatečnosti - HIV-1 a HIV-2. Tyto se od sebe geneticky i antigenně liší a dělí se na další podtypy. U typu HIV-1 rozlišujeme typ M (major), O (outliers), N (non- M-non-O). U typu HIV-2 bylo dosud nalezeno 6 podtypů. Nejdůležitějším typem je HIV-1 M typ neboli hlavní typ viru zodpovědný za globální epidemii. HIV-1 O typ a HIV- 2 jsou endemické pro západní a střední Afriku (Beneš et al., 2009).

Původ tohoto viru můžeme vysledovat v centrální Africe, pravděpodobně na území Kamerunu či Konga, kde je podle genetických testů HIV evolučně nejstarší. HIV je blíže příbuzný s opičími viry SIV-1 a SIV-2 (Simian Immunodeficiency Virus). SIV-1 byl nalezen u šimpanzů ze střední Afriky a má v něm pravděpodobně původ typ HIV-1, zatímco SIV-2 byl nalezen u zelených opiček mangabejových a dal vzniknout typu HIV-2 (**Beneš et al., 2009**). Kolem padesáti procent těchto zdravých opic bylo pozitivních na typ viru SIV-2 a stejný typ viru byl také popsán u odchycených nemocných opic druhu Makak rhesus (**Antonien, 1987**).

Odborníci se domnívají, že k přenosu na člověka došlo při porcování masa opic, které tvořily potravu tamních domorodců. Virus poté prodělal několik mutací, aby se přizpůsobil lidskému organismu a mohl se dále množit a rozšiřovat. Od svého opičího předka se virus osamostatnil v letech 1901-1921 a k přenosu došlo několikrát nezávisle za sebou. Dlouhý výzkum předcházel zjištění, kdo byl úplně prvním nakaženým, a tedy přenašečem viru. Za nejstaršího prokázaného nositele HIV viru je zatím považován kamerunský lovec, jenž zemřel v roce 1959 a v jehož plazmě se dochoval genom i protilátky proti tomuto viru (**Konvalinka a Machala, 2011**).



**Obrázek 2 - Šíření HIV v Africe**  
(Dostupné z: <http://www.avert.org/history-aids-africa.html>)

## 1.1. Historie

Virus HIV se dostal do povědomí lidí přibližně před třiceti lety. Během této doby se rozšířil prakticky po celém světě a stal se původcem celosvětově známého a obávaného onemocnění AIDS.

V poměrně krátké historii viru HIV (human imunodeficiency virus) Jan Šejda (1993) popisuje tři období. První z nich je datováno do sedmdesátých let a je označováno jako období klidu. Dochází v něm k šíření infekce hlavně v subsaharské Africe, také v USA a Karibské oblasti. Toto šíření zůstává nepoznáno a nemůže mu být tedy zabráněno.

Druhé období začíná v červnu roku 1981, kdy bylo v Centru pro kontrolu nemocí v Atlantě hlášeno pět nezvyklých případů pneumocystové pneumonie u lidí, kteří do té doby neměli žádné zdravotní komplikace. „Všichni to byli mladí homosexuální muži. Vedle pneumonie někteří z nich trpěli vzácným Kaposiho sarkomem a neobvyklými formami kvasinkových infekcí (kandidózami) (Konvalinka a Machala, 2011).“ U všech těchto mužů byla prokázána také výrazná deplece CD4+ T- buněk (Beneš et al., 2009). V témže roce bylo dále zjištěno, že výskyt všech tří onemocnění je součástí jednoho - téhož syndromu, jehož podstatou je vážný defekt buněčné imunity. Byl popsán jako AIDS (Šejda et al., 1986).

V období 1983-1984 byl izolován ve dvou na sobě nezávislých pracovištích (National Cancer Institut v USA a Pasteur institut v Paříži) virus, u kterého byl prokázán etiologický vztah k onemocnění AIDS. Tento virus byl francouzskými vědci pojmenován LAV (lymfadenopathy associated virus). Američtí vědci téměř identický virus popsali jako HTLV III (Human T- cell lymphopatic virus type III) (Šejda et al., 1986). „Na návrh Světové zdravotnické organizace byl později zaveden kompromisní název „Human Immunodeficiency Virus“, HIV (Konvalinka a Machala, 2011).“

Během tohoto období, kdy bylo objeveno agens, které onemocnění způsobuje, byly nalezeny i cesty přenosu. Zde je i počátek průkazu virových protilátek, které vedly k poznání dlouhého období latence, ale i k záchytu velkého množství infikovaných osob. Tyto události vyvrcholily první Mezinárodní konferencí o AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome) v Atlantě v USA (Šejda et al., 1993).

Třetí období, které je také nazýváno obdobím široké mobilizace vědecko-technických prostředků a zdravotnických služeb v boji proti tomuto onemocnění, přišlo těsně po Mezinárodní konferenci, na které se skupina vědců a zdravotnických pracovníků sešla na půdě Světové zdravotnické organizace. Roku 1985 se rozšířily reagentie potřebné k diagnostice infekce HIV, staly se tak komerčně dostupnými (Šejda et al. 1993). To

napomohlo tomu, aby se poznatky o všech aspektech onemocnění prohloubily a rozšířily. Tato fáze trvá dodnes, kdy díky moderní vědě a technologiím získáváme další nové poznatky.

## 1.2. Přenos HIV infekce

Virus HIV se běžně nachází v tělních tekutinách, především v krvi, spermatu, mateřském mléce a poševním sekretu. Jeho přítomnost byla v zanedbatelném množství prokázána i ve slinách, potu, slzách, ty se ale na přenosu infekce nepodílí, virus je zde obsažen ve velmi malé koncentraci. Hlavními způsoby přenosu jsou tedy pohlavní styk, krevní transfúze, infikované jehly narkomanů a přenos infekce z matky na plod (**Konvalinka a Machala, 2011**).

Při přenosu pohlavním stykem jde převážně o nechráněný pohlavní styk a to jak běžný vaginální, tak i orální a anální styk. U posledních dvou jmenovaných se uplatní možnost poranění sliznic a tím jde vlastně o přenos krevní cestou, kdy se virus dostává do drobných ranek. Tím je anální a orální přenos nebezpečnější oproti vaginálnímu přenosu (**Frei, 2011, [online]**). V poševním sekretu se virus vyskytuje v menším množství než ve spermatu, proto je rizikovější přenos z muže na ženu než obráceně. Nejlepší ochranou je kondom, ale ani v tomto případě to není stoprocentní ochrana. Hormonální antikoncepce, poševní pesar a přerušovaná soulož žádnou ochranu neposkytují (**Detailně o AIDS, [online]**).

Přenos krevní cestou patří mezi závažnější a velmi rizikový a je možný pouze relativně čerstvou krví kontaminující drobné poškození sliznic nebo kůže. Do této kategorie patří i přenos krevními transfúzemi a krevními deriváty. V dnešní době je riziko především v diagnostickém oknu, kdy nelze prokázat HIV protilátky. Všechny tyto přípravky jsou od roku 1987 testovány na přítomnost HIV, proto v našich podmínkách touto cestou k přenosu nedochází. Větší riziko je v poranění se o infikovanou jehlu, která způsobí drobnou ranku a zároveň na ní může ulpět kapka infikované krve. Podobně lze infekci přenést i jinými infikovanými předměty nebo nástroji pokud nebyly dostatečně sterilizovány, například při lékařských výkonech. Obecně platí, že HIV mimo organismus rychle hyne, ničí jej také vysoké teploty a dezinfekční přípravky. Při běžných denních činnostech a dodržování hygieny je riziko přenosu mizivé (**Frei, 2011, [online]**).

K vertikálnímu přenosu neboli přenosu z matky na plod může dojít během těhotenství při porodu nebo kojení. V České republice je takto vyšetřena každá těhotná žena. Pokud jsou u matky zjištěny protilátky proti HIV, je zahájena profylaktická léčba, aby došlo k zabránění potencionálnímu přenosu infekce na dítě. Porod pak probíhá císařským řezem na specializovaných pracovištích (**Frei, 2011, [online]**). HIV pozitivita je důvodem pro interrupci, pokud se žena rozhodne těhotenství raději ukončit. Moderní medicína umí snížit vertikální přenos o 2/3 a dokáže omezit zdravotní zátěž pro matku. Kojení není v našich podmínkách doporučeno (**Detailně o AIDS, [online]**).

### 1.3. Onemocnění

Mezi proniknutím viru do organismu a úplným projevem onemocnění uplyne několik let, během kterých se projevují různé příznaky typické pro jednotlivá stádia nemoci.

#### 1.3.1. Klinický obraz

Můžeme rozlišit tři klinická a tři laboratorní stádia (CDC 1993). Během každého z těchto stádií se projevují různé klinické příznaky onemocnění, závislé na postupujícím zhoršování imunitních funkcí. Pokud je pacient s HIV infekcí zařazen do některého z vyšších stádií, nemůže už dojít k přesunu do nižšího stádia ani tehdy, pokud by se jeho klinický stav podařilo zlepšit (**Beneš et al., 2009**).

Klasifikace HIV podle CDC 1993 (Převzato z **Beneš et al., 2009**).

- Klinická kategorie A: Akutní retrovirový syndrom, asymptomatická infekce HIV, perzistující generalizovaná lymfadenopatie.
- Klinická kategorie B: horečka vyšší než 38,5 °C déle než měsíc, průjem déle než měsíc, orofaryngeální kandidóza, vulvovaginální kandidóza (chronická, obtížně léčitelná), herpes zoster recidivující nebo postihující více dermatomů, orální chlupatá leukoplakie, lymfoidní intersticiální pneumotitida, cervikální dysplázie nebo carcinoma in situ, zánětlivá onemocnění malé pánve, listerióza, bacilární angiomatóza, trombocytopenická purpura, periferní neuropatie.

- Klinická kategorie C: pneumocystová pneumonie, toxoplasmos encefalitida, ezofageální, tracheální, bronchiální nebo plicní kandidóza, chronický anální herpes simplex, nebo herpetická bronchitida, pneumonie nebo ezofagitida, CMV rinitida, generalizovaná CMV infekce (kromě postižení jater, sleziny a lymfatických uzlin), progresivní multifokální leukoencefalopatie, recidivující pneumonie (2 a více epizod za rok), recidivující salmonelová bakteriémie, chronická intestinální kryptosporidióza (průjem déle než 1 měsíc), chronická intestinální isosporóza (průjem déle než 1 měsíc), extrapulmonární kryptokoková infekce, diseminovaná nebo etrapulmonární histoplasmosa - nevyskytuje se ve střední Evropě, diseminovaná kokcidiomykoza, tuberkulóza, diseminovaná nebo extrapulmonární mykobakteriíza, Kaposiho sarkom, maligní lymfomy (Burkittův, imunoblastický, mozku), invazivní karcinom děložního hrdla, HIV encefalopatie, wasting syndrom.

#### 1.3.1.1. Asymptomatické stádium (klinická kategorie A)

V počátku asymptomatického stádia se u více než padesáti procent pacientů, kteří byli vystaveni viru před 2-4 týdny může objevit soubor příznaků, který se označuje jako akutní retrovirový syndrom (ARS). „Nejčastěji se manifestuje jako tonzilofaryngitida s lymfadenitidou, provázená teplotami (mononucleosis-like syndrom). Jindy probíhá jako chřipkovité onemocnění (flu-like syndrom) s bolestmi kloubů a svalů, provázené často i prchavým morbidliformním enantémem, který se objevuje především na hrudníku či zádech. V dutině ústní se někdy tvoří ulcerace, jindy jsou patrné soorové povláčky. Asi u 8 % pacientů se vyskytne neurologická symptomatologie (syndrom aseptické meningitidy, encefalitida, polyradikuloneuritida). Vzácněji je ARS charakterizován gastrointestinálními příznaky a hepatosplenomegalií. Klinická symptomatologie nemusí být vždy vyjádřena **(Beneš et al., 2009).**“

V tomto období dochází k replikaci viru ve velkém, přechodně dochází k výraznému poklesu CD4+ T lymfocytů v krvi **(Staňková, 2010, [online])**. Lze prokázat p24 antigen i velké množství HIV RNA **(Beneš et al., 2009)**. V krvi pacientů nacházíme leukopenii, trombocytopenii, atypické mononukleáry. Hladina jaterních aminotransferáz a C- reaktivního proteinu může být zvýšena. Asi do tří týdnů příznaky ARS vymizí, opět se navýší T-



lymfocyty a i ostatní laboratorní testy se upraví a počet virových kopií klesne. Akutní retrovirový syndrom přejde do bezpříznakového stádia (**Staňková, 2010, [online]**).

Bezpříznakové stádium nebo také stádium latence bývá různě dlouhé a v této fázi pacient nemívá jakékoliv obtíže. Někdy se vyskytne reverzibilní zduření lymfatických uzlin, které může někdy přejít v perzistující generalizovanou lymfadenopatii. Postupně dochází ke změnám v imunitním systému, nejvýrazněji se to projeví na poklesu CD4+ lymfocytů pod 500 na mm<sup>3</sup> krve, kdy dochází k prvním příznakům snížené aktivity imunitního systému a pacient přechází do dalšího stádia (**Podrobný popis HIV/AIDS, [online]**).

#### 1.3.1.2. Časně symptomatické stádium (klinická kategorie B)

Zde dochází k výskytu nespecifických příznaků celkového onemocnění, mezi které patří noční pocení, únava, nespecifický průjem, nechutenství, úbytek hmotnosti a horečka 38,5 °C a vyšší. Počátek tohoto stádia je provázen různými projevy poškození kůže a sliznic, dále se setkáváme i s výraznou trombocytopenií nebo bolestivou periferní neuropatií. Infekce nacházející se v tomto stádiu nazýváme malé oportunní infekce (**Beneš et al., 2009**).

Období relativního zdraví se zkracuje, recidivy různých infekčních onemocnění jsou pravidlem. Také toto stádium může trvat několik let. Postupně se vyčerpávají rezervy imunitního systému, klesá počet CD4+ lymfocytů, zvyšuje se virová nálož v krvi. Nakonec se u nakaženého plně rozvíjí AIDS (**Staňková, 2010, [online]**).

#### 1.3.1.3. Pozdní symptomatické stádium (klinická kategorie C, AIDS stádium)

V tomto stádiu se setkáváme s velkými oportunními infekcemi, wasting syndromem, HIV encefalopatií a nádory, které souvisí s HIV infekcí. Narůstá virová RNA a p24 antigenémie v krvi. Počet CD4+ T lymfocytů klesne pod 200 na mm<sup>3</sup> krve. Trvání tohoto stádia je orientační, odvíjí se od řady faktorů. Během několika let dojde k vyčerpání organismu i přes důslednou terapii infekce (léčba a profylaxe oportunních infekcí) a pacient zemře (**Beneš et al., 2009**).

#### 1.3.1.4. Laboratorní stádia

Hodnotí se především počet CD4+ T lymfocytů na mm<sup>3</sup> krve. Jako první laboratorní stádium je označován počet T lymfocytů vyšší než 500 na mm<sup>3</sup> krve. V druhém laboratorním stádiu je počet T- lymfocytů v rozmezí 200- 500 na mm<sup>3</sup> krve. Ve třetím laboratorním stádiu je méně než 200 T lymfocytů na mm<sup>3</sup> krve (**Beneš et al., 2009**). Laboratorní stádia nám prozradí stav imunitního systému nemocného jedince.

#### 1.3.2. Léčba

Pokud se pacient nakazí virem HIV je toto onemocnění celoživotní a nevléčitelné. Léčebným cílem v dnešní době je prodloužení délky a zlepšení kvality života nemocných (**Frei, 2011, [online]**). Cílem léčby je zpomalení množení viru v organismu. Základní léčbu tvoří profylaxe a včasná léčba oportunních infekcí a protivirová terapie. Zpomalením množení viru v organismu se předejde úplnému zhroucení imunitního systému, který je pro život nezbytný. Konečná eliminace viru z organismu zatím není dořešena (**Podrobný popis HIV/AIDS, [online]**).

V protivirové terapii bylo dosaženo nejlepších výsledků kombinací směsí virostatik. Tyto směsi jsou označovány jako HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy). Jde o dlouhodobou kombinaci nejméně tří léků ze dvou různých skupin. Tímto je dosaženo vysoké účinnosti (**Konvalinka a Machala, 2011**). „V současné době je základem léčby kombinace dvou nukleosidových inhibitorů reverzní transkriptázy s jedním inhibitorem protézy nebo nenukleosidovým inhibitorem reverzní transkriptázy (**Konvalinka a Machala, 2011**).“

Vakcína proti HIV, preventivní nebo terapeutická, by byla nejlevnějším a nejjednodušším způsobem jak proti viru bojovat (**Konvalinka a Machala, 2011**). Tato vakcína je však stále pouze nadějí pro budoucnost, neboť světové laboratoře zabývající se touto tematikou zatím nedávají velkou naději pro její objevení. Zůstává tedy pouze dlouhotrvající, převážně neúspěšná snaha a protivirová terapie je tudíž jedinou relativně úspěšnou léčbou této infekce (**Léčba HIV a AIDS, [online]**).

**Tabulka 1 – Přehled antiretrovirových přípravků**

<b>Skupina antiretrovirotik</b>	<b>Mechanismus účinku</b>	<b>Příklady antivirotik</b>
Inhibitory reverzní transkriptázy – nukleosidové	Blokace přepisu virové RNA do DNA. Náhrada přirozených nukleosidů za chemické látky podobné nukleosidům, které zastaví prodlužování řetězce	Zinovudin, dideoxycytidin, dideoxyinosin, stavudin, lamivudin, abacavir, emtricitabin, tenofovir
Inhibitory reverzní transkriptázy- nenukleosidové	Blokace reverzní transkriptázy vazbou inhibitoru do alosterického místa enzymu.	Ripivirine, etravirine, delavirdine, efavirenz, nevirapine
Inhibitory HIV- proteázy	Blokace vazebného místa pro substrát HIV- proteázy inhibitorem.	saquinavir, tipranavir, indinavir, lopinavir, ritonavir, darunavir
Inhibitory virové integrázy	Blokace virové integrázy- včlenění virové DNA do genomu napadené buňky	elvitegravir, raltegravir
Inhibitory vstupu viru do buňky	Blokace navázání viru na buněčný receptor	enfuvirtid, maraviroc

*Zdroj:* Konvalinka et Machala, 2011 (převzato z textu do tabulky), Jednotlivá antivirotika převzatá z [//www.fda.gov/ForConsumers/byAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDSActivities/ucm118915.html](http://www.fda.gov/ForConsumers/byAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDSActivities/ucm118915.html)

Účinná léčba se hledala už od počátku objevu viru HIV. V tomto období byla léčba nakažených pacientů velmi složitá a zaměřovala se pouze na infekce a další projevy související s postižením imunitního systému. V roce 1985 se prvním účinným lékem stal zidovudin, nazývaný také azidothymidin. Byl to první inhibitor reverzní transkriptázy a měl velmi výrazné vedlejší účinky. Tento lék je užíván v terapii dodnes, i když v mnohem menších dávkách než na počátku. Během dalších let byly přidávány další léky, které se rozdělily podle vlastností do tří skupin: inhibitory reverzní transkriptázy, inhibitory nukleotidové a inhibitory nukleosidové a nenukleosidové. V polovině devadesátých let pak byly objeveny inhibitory HIV - proteázy, které v kombinaci s inhibitory reverzní transkriptázy poskytují velmi účinnou léčbu HAART. V poslední době se začínají používat i léky ze skupin s odlišnými mechanismy účinku jako jsou například inhibitory vstupu viru do buňky, které

mohou zabránit šíření viru do dalších buněk organismu. Tato léčba je ještě v začátcích, nicméně poskytuje velkou naději pro budoucnost, hlavně tam, kde standardní léčba selhává (**Léčba HIV a AIDS, [online]**).

„Při vývoji léků proti HIV se lze teoreticky zaměřit na kterýkoliv z kroků životního cyklu viru: navázání viru k receptoru, fúzi s hostitelskou buňkou, reverzní transkripci (přepis genetické informace z virové RNA do DNA), transport DNA do jádra a její integraci do chromozomu prostřednictvím virové integrázy, replikaci virové DNA, transkripci, translaci, skládání virionu, jeho pučení a maturaci. V léčebné praxi pacientů s HIV infekcí se zatím používají hlavně inhibitory reverzní transkriptázy (blokující přepis virové RNA na DNA, která je schopná integrace do genomu), inhibitory virové protézy, inhibitory virové integrázy a inhibitory vstupu viru do buňky (**Konvalinka a Machala, 2011**).“ Jednotlivé skupiny antivirotik jsou uvedeny v tabulce 1.

#### **1.4. Současná epidemiologická situace**

Sledování epidemiologické situace má pro studium viru HIV nesporný význam a to jak v světovém či regionálním měřítku. Tento monitoring nám umožňuje zjistit počet případů již nakažených pacientů nebo nových případů a vyvodit z těchto údajů nějaké závěry.

##### **1.4.1. Současná epidemiologická situace ve světě**

V prosinci roku 2012 byla zveřejněna poslední statistická data týkající se HIV/AIDS epidemie. Tyto údaje publikuje UNAIDS, WHO a UNICEF, údaje se vztahují ke konci roku 2011 (**Global HIV and AIDS estimates, [online]**).

Třicet čtyři milionů, to je počet lidí, kteří se v roce 2011 potýkali s onemocněním HIV/ AIDS. Nakažených dětí byly 3,3 miliony. V roce 2011 přibylo dva a půl milionů nakažených, z toho 330 000 byly děti. Na onemocnění AIDS zemřelo v roce 2011 1,7 milionů lidí (**Global HIV and AIDS estimates, [online]**).

Celkový růst epidemie byl v posledních letech stabilizován. Roční počet nově nakažených neustále klesá a díky zvýšenému počtu lidí užívající antiretrovirotika klesá i počet

úmrtí. Přitom od počátku epidemie zemřelo skoro 30 milionů lidí. Nejvyšší podíl nemocných je stále v subsaharské Africe a činí 69 % ze všech nakažených. V Asii zůstává epidemie relativně stabilní a koncentruje se do rizikových skupin. Na druhou stranu se počet nakažených ve východní Evropě a střední Asii od roku 2000 více než ztrojnásobil (**Global HIV and AIDS estimates, [online]**).

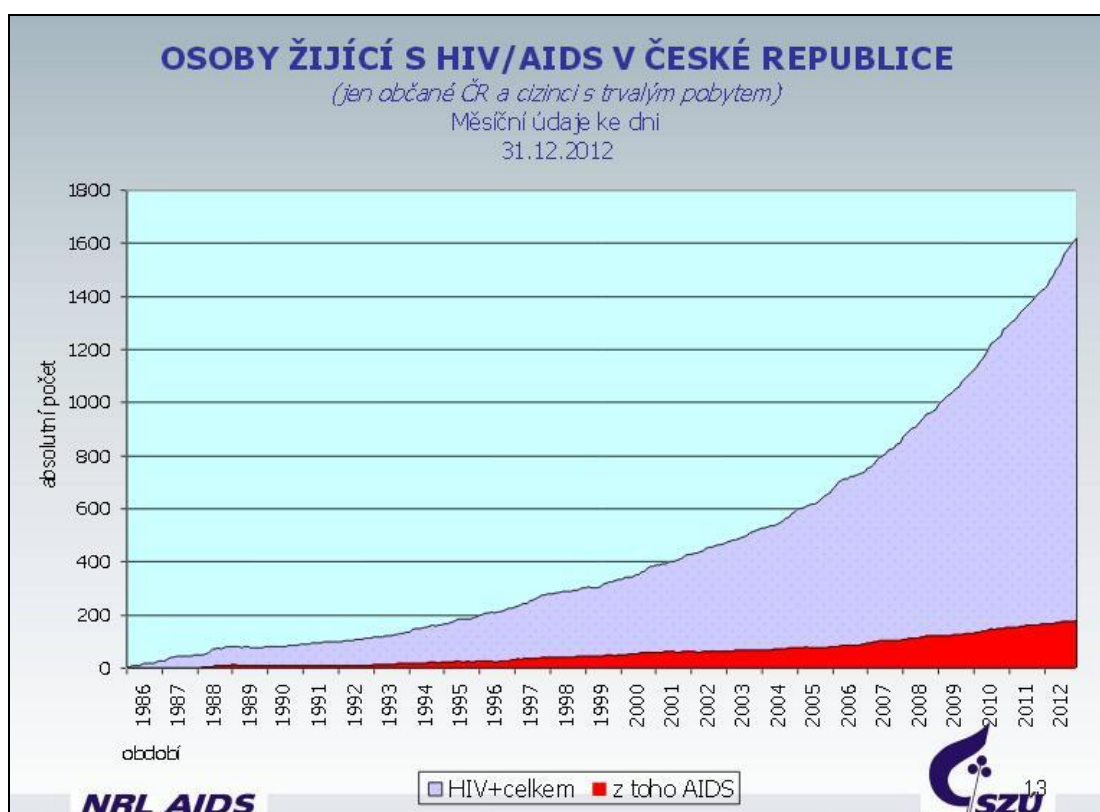
UNAIDS vydal k této příležitosti také publikaci Global Report, ve které se mohou zájemci o tuto problematiku dovědět více informací ohledně celosvětového boje proti infekci HIV/AIDS.

Je definováno i 10 specifických cílů pro rok 2015 (**Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2012, 2012**):

1. Snížit sexuální přenos infekce pod 50 %.
2. Snížit přenos mezi lidmi užívající drogy pod 50 %.
3. Eliminovat počet nově nakažených dětí a snížit počet matek umírajících na AIDS.
4. Poskytnout antiretrovirovou terapii 15 milionům lidí.
5. Snížit počet lidí s HIV infekcí, kteří umírají na tuberkulózu pod 50 %.
6. Uzavřít nedostatečnosti ve zdrojích pro infekci HIV/AIDS a dosáhnout roční celosvětové investice z 22 miliard na 24 miliard amerických dolarů v zemích s nízkými a středními příjmy.
7. Odstranit nerovnosti mezi pohlavím a na pohlaví závislé obtěžování a násilí. Zvýšit počet dívek a žen, které budou chráněny před infekcí HIV.
8. Odstranit stigma a diskriminaci proti jedincům žijícím s HIV/AIDS uvedením práv a politiky, které zajistí plnou realizaci lidských práv a základních svobod.
9. Odstranit omezení pobytu, vstupu a pobývání pro jedince mající HIV/AIDS .
10. Odstranit paralelní systémy pro služby související s HIV k zesílení integrace reakce na AIDS v oblasti celosvětového zdraví i vývojových snah.

## 1.4.2. Současná epidemiologická situace v ČR

Tisková zpráva Národní referenční laboratoře pro HIV/AIDS z 28. ledna 2013 uvádí data za rok 2012 v České republice. Podle této zprávy je trend výskytu HIV/AIDS v ČR dlouhodobě výrazně narůstající. Za rok 2012 bylo zachyceno 212 nových případů infekce HIV. Toto číslo zahrnuje nejen občany ČR, ale i dlouhodobě pobývajících cizince a dosud se jedná o nejvyšší celoroční výskyt v ČR. Také byla překročena hranice 2 případů na 100 000 obyvatel, pro ČR toto číslo odpovídá 211 případům ročně. Česká republika se tak už nemůže dále řadit mezi země s nejnižším výskytem HIV v Evropě. Oproti roku 2011 vzrostl počet případů o 59 a s porovnáním s rokem 2010 o 32 případů (**Tisková zpráva Národní referenční laboratoře pro HIV/AIDS, 2012**).



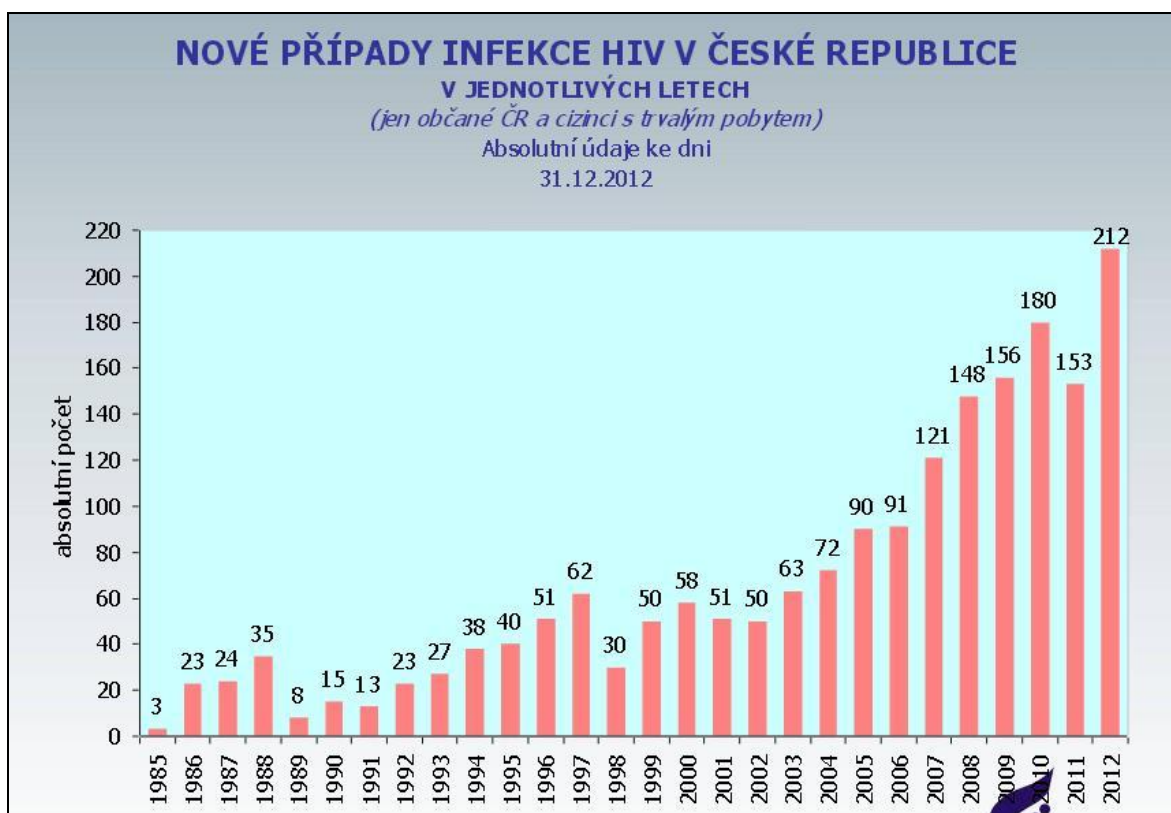
**Graf 1 - Osoby žijící s HIV/AIDS v České republice**

(Dostupné z:

[http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/HIV\\_AIDS/rocni\\_zpravy/2012/trendy\\_HIVAIDS\\_CR\\_20130128\\_grafy.pdf](http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/HIV_AIDS/rocni_zpravy/2012/trendy_HIVAIDS_CR_20130128_grafy.pdf))

Mezi nově infikovanými je více mužů než žen, ale klesající trend v počtu infikovaných žen se zastavil a nyní mírně narůstá. V asymptomatickém stádiu bylo zachyceno 73,6 % infikovaných. Ve stádiu akutní infekce to bylo 12,7 %. Pozdní záchyty představují 6,6 % ve

stádiu symptomatickém non- AIDS a 7,1 % ve stádiu AIDS (**Tisková zpráva Národní referenční laboratoře pro HIV/AIDS, 2012**).



**Graf 2 - Nové případy infekce HIV v České republice**

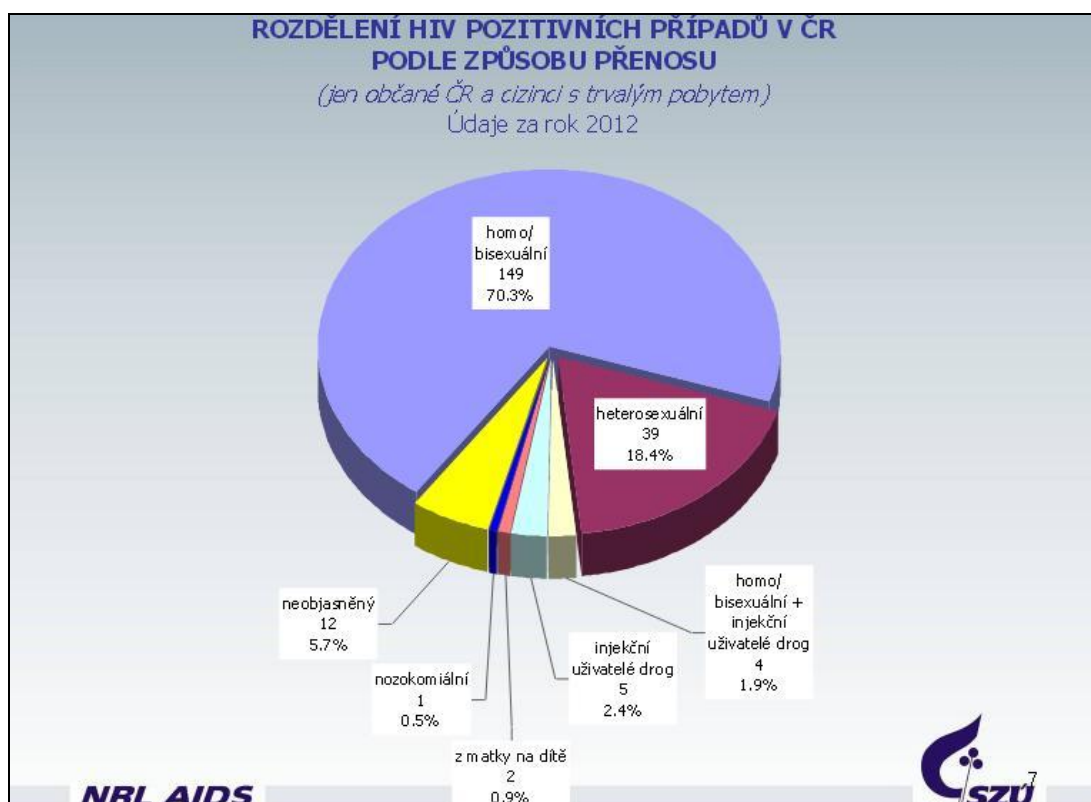
(Dostupné z:

[http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/HIV\\_AIDS/rocní\\_zpravy/2012/trendy\\_HIVAIDS\\_CR\\_20130128\\_grafy.pdf](http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/HIV_AIDS/rocní_zpravy/2012/trendy_HIVAIDS_CR_20130128_grafy.pdf))

Kraj s dominujícím výskytem je Praha, což odpovídá dlouhodobému vývoji. Z 212 nových případů bylo 61 respondentů zejména ze Slovenska, Ukrajiny, Ruska, Polska, Moldavska, Lotyšska, Srbska a Vietnamu. Podíl těchto respondentů v celkovém vývoji narůstá a nyní se blíží až k 30 % (**Tisková zpráva Národní referenční laboratoře pro HIV/AIDS, 2012**).

Hlavní cestou infekce v České republice je přenos sexuální cestou s vysokým podílem homo/bisexuálního přenosu, který je pro ČR typický. V roce 2011 se ČR řadila v tomto aspektu na první místo v Evropě. K heterosexuálnímu přenosu došlo u dvaceti mužů a u devatenácti žen. Další sexuálně přenosná nemoc byla zjištěna u 22,2 % nových případů. Dlouhodobě nízkým podílem se do cest přenosu zapojuje skupina injekčních uživatelů drog. V roce 2012 to byli dva muži a tři ženy. Dva nově zachycené případy HIV byly zaznamenány

u dětí. Jednalo se o sourozence z rodiny respondentů. Oba jejich rodiče jsou HIV pozitivní. Pravděpodobně šlo o přenos od matky, porod neprobíhal na území ČR a žena neprošla screeningem u těhotných žen v ČR. HIV pozitivním matkám se narodilo devět dětí, šest z nich o své HIV pozitivitě vědělo, tři byly zachyceny při těhotenském screeningu. Byl zachycen i jeden nozokomiální původ nakažení u residentky, ke kterému došlo v zahraničí. Dvanáct případů přenosu zatím nebylo objasněno, dotyční se nedostavili do AIDS centra. Při screeningu dárců krve bylo zachyceno šest nových případů HIV infekce (**Tisková zpráva Národní referenční laboratoře pro HIV/AIDS, 2012**).



**Graf 3 - Rozdělení HIV pozitivních případů v ČR podle způsobu přenosu**

(Dostupné z:

[http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/HIV\\_AIDS/rocní\\_zpravy/2012/trendy\\_HIVAIDS\\_CR\\_2013\\_0128\\_grafy.pdf](http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/HIV_AIDS/rocní_zpravy/2012/trendy_HIVAIDS_CR_2013_0128_grafy.pdf))

Onemocnění AIDS bylo zjištěno v dvaceti dvou nových případech. Třináct případů bylo zjištěno u obyvatel ČR, devět případů u respondentů, z toho sedmáct případů u pacientů s HIV pozitivitou zjištěnou až v roce 2012. Bylo zaznamenáno devět případů úmrtí ve stádiu AIDS a tři případy úmrtí pacientů s HIV pozitivitou z jiných příčin (**Tisková zpráva Národní referenční laboratoře pro HIV/AIDS, 2012**).



Výrazně roste počet žijících s HIV/AIDS pozitivitou, a proto dochází k navýšení počtu lidí potřebujících antiretrovirovou léčbu. Nyní ji pobírá asi tisíc sto pacientů (**Tisková zpráva Národní referenční laboratoře pro HIV/AIDS, 2012**).

Na závěr ještě pár souhrnných dat. Od počátku sledování HIV pozitivních v ČR (1. 10. 1985) k 31. 12. 2012 bylo celkově zjištěno 1887 případů. Z toho 1512 případů bylo u občanů České republiky a 375 u rezidentů. U 366 z nich došlo k rozvinutí onemocnění AIDS, z celkového počtu případů 266 pacientů již zemřelo, z toho 187 úmrtí bylo ve stádiu AIDS a 79 z jiné příčiny (**Tisková zpráva Národní referenční laboratoře pro HIV/AIDS, 2012**).

## 2. Epidemiologická opatření

Epidemiologická opatření jsou taková opatření, která zabraňují dalšímu šíření onemocnění mezi populací. Jsou dvojího druhu, preventivní a represivní. Preventivní opatření, jsou taková opatření, která se provádí ještě před vypuknutím nákazy. Represivní opatření se provádí v době, kdy je podezření na vznik nákazy.

### 2.1. Preventivní opatření

Mezi preventivní opatření patří od roku 1987 testování krevních konzerv a jiných krevních derivátů. Dále pak mezi preventivní opatření můžeme zařadit svědomitou osvětu a výchovu v oblasti bezpečného sexuálního života a v oblasti aplikace návykových látek. V západním světě je zakázáno HIV pozitivním matkám kojení. I takto se virus HIV může přenést z matky na dítě. V rozvojových zemích toto opatření není možné, neexistuje zde žádný alternativní způsob výživy dítěte a nekojené dítě by záhy po vysazení kojení zemřelo. V prevenci AIDS hraje důležitou úlohu také posílení obranyschopnosti organismu (**Epidemiologie AIDS, [online]**).

V současné době nejsou žádná další specifická preventivní opatření. Proti infekci HIV neexistuje účinná vakcína a nejsou známy profylaktické preparáty (**Podrobný popis HIV/AIDS, [online]**).

#### 2.1.1. Bezpečný sex

Onemocnění AIDS je sexuálně přenosným onemocněním. Chování mířící k sexuálnímu styku s infikovanou osobou zvyšuje riziko nákazy. Prevence nákazy HIV/AIDS je především zaměřena na změnu životního stylu. Homosexuální a bisexuální muži jsou nejvýznamnější skupinou nemocných. Zejména ti, kteří vystřídají velké množství sexuálních partnerů. Zastavení nebo omezení šíření infekce v rámci této skupiny je proto rozhodujícím opatřením. Tito muži by měli mít pouze jednoho sexuálního partnera a omezit nahodilé sexuální styky s neznámými osobami. Dalším rizikovým chováním je rektální soulož, a to hlavně pro „příjemce“. Ten, kdo se nechce, nakazit by proto měl od této sexuální praktiky upustit. Jednou z možností ochrany je použití kondomu, ale ani tato metoda není stoprocentní.

Lidé patřící do rizikových skupin by se tedy měli stýkat pouze s jedním sexuálním partnerem a vyhýbat se nahodilým sexuálním stykům s osobami, které neznají, hlavně s cizinci (Syrůček, Šejda, Ticháček, 1986).

### **2.1.2. Osoby užívající návykové látky**

Druhý možný způsob přenosu HIV do organismu je skrz kontaminovanou krev. K tomuto přenosu může dojít hlavně u narkomanů. Tyto osoby by v rámci prevence měly podstoupit vhodné léčení, zbavit se závislosti na návykových látkách a nikdy nesdílet injekční stříkačky a jehly. V kolektivu by se ze stejného důvodu měly individualizovat zubní kartáčky, holicí strojky a ostatní osobní předměty, u kterých je riziko přenosu infekce (Syrůček, Šejda, Ticháček, 1986).

### **2.1.3. Těhotenství**

Eliminace vertikálního přenosu infekce mezi matkou a plodem při porodu je možná farmakologicky pomocí antivirotik. Způsob vedení porodu je také velmi důležitý. Tyto preventivní opatření dokážou snížit riziko přenosu pod 3 %. Normálně se toto riziko pohybuje kolem 20 – 25 % (Prevence přenosu HIV, [online]).

### **2.1.4. Parenterální přenos**

Zpočátku pandemie byl velmi častý parenterální přenos infekce. Jednalo se hlavně o přenos skrz infikované krevní konzervy a nesterilní nástroje. Tento způsob byl eliminován zavedením testováním krevních konzerv a krevních derivátů. Důsledná sterilizace dezinfekce dále eliminují nozokomiální přenos infekce. Parenterální přenos stále hrozí mezi narkomany, o kterých je pojednáno výše (Prevence přenosu HIV, [online]).

### **2.1.5. Postexpoziční profylaxe**

Pokud existuje riziko infekce HIV, může být zvážena postexpoziční profylaxe. Rozhodující vliv má velikost rizika infekce, nežádoucí účinky antiretrovirotik a spolupráce

pacienta. Důležitá je i doba od expozice. Se zvyšujícím se časem klesá účinnost profylaxe a 72 hodin po expozici nemá už smysl profylaxi podávat **(Beneš et al., 2009)**.

Mezi postexpoziční profylaxi se mimo jiné řadí opatření po poranění kontaminovaným předmětem. V tomto případě postexpoziční profylaxe spočívá v řádném ošetření poranění, jeho desinfekci a jednoměsíční podávání antivirotik **(Prevence přenosu HIV, [online])**.

## **2.2. Represivní opatření**

Represivní opatření jsou opatřeními v době, kdy už vznikla nákaza. Řadí se mezi ně následující: včasná a správná diagnostika onemocnění, hlášení nemocných a podezřelých z nákazy, izolace nemocného a epidemiologická šetření v ohnisku nákazy **(Protiepidemiologická opatření v ohnisku nákazy[online])**. Hlášení pro Národní referenční laboratoř pro AIDS o HIV reaktivitě/pozitivitě, onemocnění AIDS a úmrtí na tuto infekci je povinné dle zákona č. 258/2000 Sb. Karanténa ani omezení sociálního styku není nutné vzhledem k možným cestám přenosu. Výkon povolání závisí na zdravotním stavu nakaženého, nikoliv na nálezu HIV pozitivitivy **(Podrobný popis HIV/AIDS, [online])**.

Základem kontroly šíření infekce je její včasná diagnostika. Pokud infikovaný zjistí, že je HIV - pozitivní, omezí ve většině případů své chování, při kterém by mohlo dojít k přenosu infekce na jiného jedince buď sexuálním stykem, nebo užíváním drog. Včasným poskytnutím návazné lékařské péče se zamezí šíření infekce v komunitě, sníží se riziko úmrtí a riziko výskytu nemocí souvisejících s HIV, neboť léčba sníží virovou zátěž v organismu **(Brůčková, 2007)**.

### 3. Vývoj diagnostiky HIV

Vývoj diagnostiky HIV a onemocnění AIDS byl umožněn rychlým nárůstem poznatků o tomto agens i vyspělými možnostmi moderní virologie a molekulární biologie. Díky tomu byl tento vývoj velmi rychlý. Už dva roky po objevu původce bylo možno využít specifické laboratorní diagnostiky. V dalším období došlo ke zdokonalení a zpřesnění diagnostických systémů a zvýšení specifčnosti a senzitivity (Šejda et al, 1993).

V knize Prevence, léčba a další aspekty nákazy HIV/AIDS v kapitole Mikrobiologická diagnostika infekcí vyvolaných HIV je uvedeno toto schéma (Šejda et al., 1993):

Vývoj diagnostiky infekce HIV/ AIDS:

- 1981 Objev onemocnění AIDS
- 1983-84 Objev viru HIV (kultivace na citlivých buněčných liniích)
- 1985 Detekce antiHIV protilátek (komerční testy)
- 1986 Detekce antigenu (komerční testy)
- 1986-88 Testy druhé a třetí generace pro detekci antiHIV protilátek
- 1986-88 Průkaz virové RNA a DNA v hostitelských buňkách molekulárně biologickými metodami

#### 3.1. 80. léta

Od poloviny osmdesátých let byla diagnostika HIV založena na detekci cirkulujících protilátek proti HIV. Běžně byl používán jeden screeningový test následovaný testem konfirmačním v případě, že byl screeningový test reaktivní. Nejvíce rozšířeným screeningovým testem byla ELISA, jako konfirmační se používal western blotting nebo imunofluorescenční analýza (HIV diagnostic overview, 2008, [online]).

Od roku 1985 byly vytvořeny čtyři úspěšné generace imunoenzymatických testů. Každá nová generace těchto testů snížila diagnostické okno a zlepšila detekci časně infekce. Imunoenzymatické testy zůstaly centrálními testy diagnostiky HIV infekce, přestože byla

postupně vytvořena spousta úprav a modifikací v základní technologii imunoenzymatických testů ( **Chappel, Wilson, Dax, 2009**).

První generace imunoenzymatických testů využívala lyzát HIV jako zdroj antigenu k záchytu protilátek ve vzorku. Tato generace měla spousta problémů s přípravou antigenu a vykazovala velké množství falešně pozitivních výsledků díky kontaminaci antigenu proteiny z buněk použitých pro buněčnou kulturu HIV. Brzy bylo zjištěno, že nízká specificita těchto testů musí být kompenzována a při reaktivním výsledku byl využíván western blotting jako druhý, konfirmační test k rozlišení pravé a falešné positivity. V některých případech, ale western blotting dával vysoký počet neurčitých výsledků. To znamená, že výsledky nebyly negativní, ale nesplňovaly kritéria pro výsledek pozitivní. Toto množství neurčitých výsledků bylo sníženo line-immunoassay testy, kdy antigen je aplikován na celulózovou destičku. Testy Line- immunoassay jsou více používány v Evropě ( **Chappel, Wilson, Dax, 2009**).

V roce 1987 se v krevních bankách začaly používat testy druhé generace, které snížily diagnostické okno z 56 na 42 dní. Tyto testy, z počátku závislé na přípravě rekombinantního antigenu z *Escherichia coli*, byly umožněny kompletní sekvencí genomu HIV viru. Falešně reaktivní testy byly nadále velmi časté z důvodu kontaminace bakteriálních proteinů. Testy druhé generace jsou nadále používány v některých amerických laboratořích, reaktivní výsledky jsou potvrzovány western blottem. Stále existuje množství neurčitých výsledků, které nebyly nikdy úplně zvládnuty ( **Chappel, Wilson, Dax, 2009**).

### **3.2. 90. léta**

Na počátku devadesátých let byly uvedeny testy třetí generace imunoenzymatických testů. Významně byl změněn formát imunoenzymatických testů. Byla použita sendvičová technika využívající konjugovaný antigen. Tento antigen byl schopen rozeznat všechny třídy imunoglobulinů. Zvýšila se tak senzitivita imunoenzymatických testů, protože IgM protilátky se objevují již v rané fázi infekce, dříve než IgG protilátky, které využívaly testy druhé generace. Diagnostické okno bylo sníženo na 20-25 dní a došlo k urychlení diagnostiky. Ještě před čtvrtou generací imunoenzymatických testů byly vyvinuty imunoenzymatické testy pro stanovení samotného antigenu p24 ( **Chappel, Wilson, Dax, 2009**).

### 3.3. Vývoj po roce 2000

Po roce 2000 se začaly používat imunoenzymatické testy čtvrté generace. Ve Spojených státech amerických byly schváleny až v roce 2010. U těchto testů došlo ke spojení detekce antigenu p24 a antiHIV protilátek. Tímto spojením došlo k dalšímu zvýšení senzitivity imunoenzymatických testů v diagnostice HIV. Došlo také ke snížení diagnostického okna na 5 dní a záchytu infekce v dřívějších stádiích. Dalšími výhodami testů čtvrté generace je nižší nákladnost, snížení času analýzy a potřeby laboratorního personálu (**Galbraith, 2011 [online]**).

Občasná hlášení ukazují, že by kombinované imunoenzymatické testy měly mít nižší senzitivitu než imunoenzymatické testy samotného antigenu p24. Tento rozdíl v senzitivitě ruší další vylepšení imunoenzymatických testů čtvrté generace, a to především snížením detekčního limitu pro antigen p24 (**Chappel, Wilson, Dax, 2009**).

Po roce 2000 se začaly více využívat i rychlé testy, i když byly vyvinuty dříve (v roce 2009 to bylo 15 let jejich dostupnosti) (**Chappel, Wilson, Dax, 2009**). Jde vlastně o sofistikované laboratorní metody, které byly vyvinuty v jiném formátu tak, aby se daly použít mimo laboratoř (**HIV diagnostic overview, 2008, [online]**).

V posledních letech se do běžné screeningové diagnostiky dostávají i testy na principu NAT (nucleic acid test). Tyto testy se používají k detekci malého množství DNA nebo RNA v testovaných vzorcích. Principem těchto testů je namnožení úseků DNA nebo RNA, které zvýší signál nukleových kyselin ve vzorku a usnadní identifikaci. Tyto testy umožňují diagnostikovat onemocnění už při malém množství patogenu v organismu. (**Boskey, 2011, [online]**). Testování začíná rychlým testem, vyšetřovaným materiálem jsou sliny. Pokud je tento test reaktivní, pacient je informován a proběhnou standardní testy na HIV. Pouze v případě, že tyto testy vyjdou negativní, přistoupí se k testům NAT. Skoro čtvrtina pacientů s HIV má reaktivní výsledek pouze u testů NAT (**Kain, 2010, [online]**).

### 3.4. Vývoj v České republice

K odborníkům v České republice se dostaly informace o výskytu nového infekčního agens velmi brzy po popisu prvních případů. V roce 1985 byla ustanovena Národní referenční laboratoř pro HIV/AIDS v Institutu hygieny a epidemiologie, později přejmenovaném na Státní zdravotní ústav. Vedením byl pověřen doc. MUDr. Lubomír Syruček. Laboratorní diagnostika hrála vůdčí roli v diagnostice HIV/AIDS. Hlavně u krevních dárců byla její včasnost velmi důležitá. Nejtěžším úkolem bylo dát dohromady odborníky, kteří by byli ochotni pracovat s novým etiologickým agens, které nebylo dostatečně prozkoumáno a způsobovalo nevyhléditelné smrtelné onemocnění. Nakonec se tým odborníků na laboratorní diagnostiku podařilo vytvořit **(Brůčková, 2012)**.

Prvními metodami, které se v diagnostice HIV/AIDS začaly používat, byly práce s živým virem na tkáňových kulturách, imunofluorescenční testy a imunoenzymatické techniky - EIA. Vedoucí pracovníci byli také posíláni na stáže do zahraničí, kde se s virem HIV pracovalo. Zde nacházeli podmínky pro práci s tímto virem a získávali cenné poznatky. Na konci stáže v londýnském Public Health Laboratory Service získala Marie Brůčková infikovanou tkáňovou kulturu, kterou přivezla úspěšně zpět do Prahy. Později získala i diagnostický test pro stanovení protilátek od firmy Abbott. Tyto první testy byly vyráběny z purifikovaného inaktivovaného viru a nesly označení infekční materiál **(Brůčková, 2012)**.

Rok 1987 přinesl povinné testování krevních dárců a krevních derivátů na infekci HIV a také bylo zavedeno diagnostické testování v mikrobiologických laboratořích. Tyto laboratoře musely splnit podmínky posuzované Národní referenční laboratoří. Od počátku byly do praxe zavedeny také konfirmační testy takových vzorků, u kterých byl výsledek neurčitý, tedy nikoliv jasně negativní nález. Tyto nejasné výsledky poskytovaly hlavně testy první generace a systémem konfirmačních testů v NRL se nejasné pozitivní výsledky daly vyloučit. Toto opatření platí i dnes. Vzniklo sedm klinických center pro léčbu AIDS. Tyto centra spolupracují s NRL a výsledky jsou pak poskytovány mezinárodním organizacím **(Brůčková, 2012)**.

Kontinuálně probíhalo a stále probíhá zdokonalování a rozšiřování laboratorních technik, jako je sledování virové nálože nebo resistance na antiretrovirové preparáty. Nejméně



důležité jsou analýzy izolovaných virových kmenů HIV a jejich subtypizace. Výsledky se stávají podklady pro molekulární epidemiologii viru. V poslední řadě probíhal v ČR také základní výzkum HIV přinášející některé zásadní poznatky (studium HIV virových proteáz) **(Brůčková, 2012)**.

## 4. Laboratorní diagnostika

Diagnostika onemocnění se dělí do dvou kategorií. Klinickou diagnostiku, kterou provádí lékař na základě příznaků onemocnění a celkového stavu pacienta (viz. kapitola 1.3.1.) a diagnostiku laboratorní, která je prováděna v laboratořích na základě výsledků skupiny testů biologického materiálu od pacienta. Diagnostika nám pomůže rozpoznat v jaké fázi je onemocnění a jak je účinná případná léčba.

Předpokladem pro stanovení infekce virem HIV, stejně jako diagnózy onemocnění AIDS je mikrobiologická laboratorní diagnostika (**Šejda et al., 1993**). Laboratorní diagnostika virových infekcí může být přímá, kde stanovujeme virus pomocí antigenu či jeho izolací, nebo nepřímá, sérologická, která je zaměřena na průkaz tvorby protilátek.

Materiál, který má být vyšetřen musí být řádně označen a dokumentován. Označení vlastního materiálu musí odpovídat průvodnímu listu. U infekce HIV je to velmi důležité, zabrání se tak možné záměně biologického materiálu pacienta s HIV a zdravého jedince (**Šejda et al., 1993**).

### 4.1 Odběr materiálu pro vyšetření

Vyšetřovaným materiálem je sérum. Pro detekci antigenu nebo antiHIV protilátek je možné využít i další tělní tekutiny jako je mozkomíšní mok nebo sliny. Pokud se bude jednat o izolační průkaz viru, odebíraným materiálem je krev odebraná do natriumheparinu nebo draselných solí EDTA, sperma, vaginální sekret nebo různé tkáně (**Šejda et al., 1993**).

Pokud nedojde k vyšetření séra ihned po odběru je možno ho uchovat do 2 dnů při 4 °C. Neomezeně dlouho můžeme sérum skladovat při -20 °C. K oddělení séra od plné krve musí dojít do 3 dnů. Plná krev nelze zamrazit (**Šejda et al., 1993**).

Při odběru i následnému zpracovávání materiálu v laboratoři je nutno dbát na to, že každý biologický materiál je potencionálně infekční. Odebírající i laboratorní personál by měl používat jednorázové odebírací sady a laboratorní ochranné pomůcky a dodržovat zásady pro práci s biologickým materiálem (**Šejda et al., 1993**).

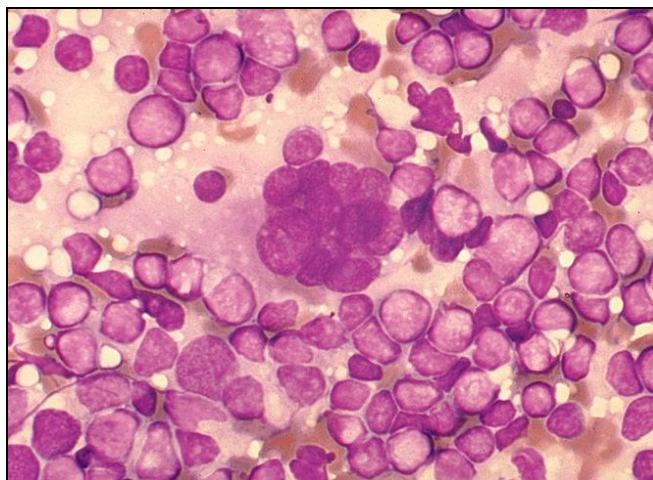
## 4.2. Přímá diagnostika

Přímý průkaz infekce HIV je vyhrazen pro speciální případy diagnostiky u osob s vysokým rizikem infekce, které zůstávají dlouho protilátkově negativní, pro diagnostiku u dětí a novorozenců a také pro experimentální účely - sledování účinnosti antiHIV terapie. Důvodem je obtížnost, nákladnost a nebezpečnost metod pro laboratorní personál (**Šejda et al., 1993**).

Mezi testy patřící do přímého průkazu infekce HIV patří: detekce v klinickém materiálu kultivací na tkáňových kulturách, detekce antigenu p24 v infikovaných buňkách nebo tělních tekutinách, detekce virových částic v infikovaných buňkách vizualizací v elektronovém mikroskopu a také detekce genomu HIV v infikovaných buňkách (**Šejda et al., 1993**).

### 4.2.1. Kultivační metody

Tkáňové kultury jsou základem pro virologickou laboratoř, umožňují pěstování většiny virů. Tkáňová buňka je označení pro buňku, tkáň nebo orgán, které jsou pěstovány in vitro. Očkování virem probíhá až po vytvoření monolayeru tkáňových buněk. Buňky se inkubují při 35 – 37 °C. Prohlížení postižených buněk probíhá pod mikroskopem, protože buňka postižená virem se většinou změní a vznikne cytopatický



**Obrázek 3 - Syncytium – Cytopatický efekt HIV**

(Dostupné z:

<http://pathmicro.med.sc.edu/lecture/images/multinuc.jpg>)

efekt, který může být typický pro určitý virus. Díky cytopatickému efektu můžeme virus určit. Pokud nám nenapoví cytopatický efekt, provedeme další testy nebo kultivace na jiné tkáňové kultuře (**Votava, 2000**). V diagnostice HIV se využívají pro tkáňové kultury především mononukleární buňky periferní krve (**Šejda et al., 1993**). Za cytopatický efekt viru považujeme změnu buňky, ve které se virus pomnožil a je patrný při prohlížení buněk tkáňové

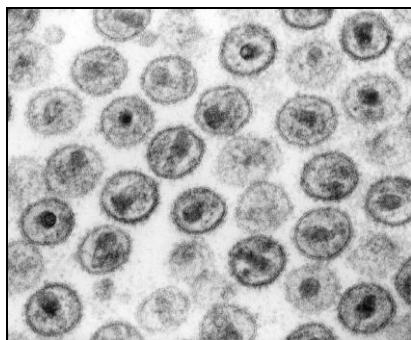
kultury pod mikroskopem (**Votava, 2000**). Charakteristickým jevem pro cytopatický efekt viru HIV je buněčná fúze, kdy vznikne mnohojaderný útvar - syncytium (**Hunt, [online]**).

#### 4.2.2. Detekce antigenu p24

Protein p24 je nejčastějším antigenem vyvolávajícím protilátkovou odpověď na infekci HIV. Nadbytek proteinu p24 je produkován brzy v průběhu infekce a může být detekován v krvi. Pokud je však HIV v těle plně rozvinut, tento antigen dosahuje neměřitelných hodnot. Díky nízké senzitivitě a použití pouze na počátku infekce HIV není možné tento test užívat pro běžné účely, ale stává se součástí testů čtvrté generace. Tyto testy kombinují stanovení antigenu p24 a stanovení protilátek. Dochází tak ke snížení diagnostického okna. Výhodou spojení testování protilátek a proteinu p24 je možnost dřívější a přesnější diagnostiky HIV. Jedná se o poměrně novou metodu testování HIV. Ve Spojených státech amerických bylo první takovéto testování schváleno FDA v roce 2010 (**HIV testing, [online]**).

Detekce antigenu p24 probíhá v infikovaných buňkách, nejčastěji mononukleárech pomocí testů značených protilátek jako je EIA nebo IFT, cytochemických reakcích - peroxidázová reakce a pomocí molekulárně - biologických metod. Pokud testujeme v tělních tekutinách, využívají se testy EIA (**Šejda et al., 1993**).

#### 4.2.3 Elektronová mikroskopie



**Obrázek 4 - Virus HIV pod elektronovým mikroskopem**

(Dostupné z:  
[http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:  
HIV-  
1\\_Transmission\\_electron\\_micrograp  
h\\_AIDS02bbb\\_lores.jpg](http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:HIV-1_Transmission_electron_micrograph_AIDS02bbb_lores.jpg))

Elektronová mikroskopie zaujímá ve virové diagnostice své pevné místo. Spolehlivé a rychlé stanovení virionů přímo ve vyšetřovaném materiálu umožňuje technika negativního kontrastu. Tato technika je nápomocná u všech virů, jejichž kultivace se zatím nedaří (**Votava, 2000**).

Dalšími technikami užívanými v diagnostice jsou imunoelektronová mikroskopie s použitím různých

barvicích technik a rastrovací elektronová mikroskopie (Šejda et al., 1993).

### 4.3. Průkaz virového genomu

Průkaz virového genomu patří mezi metody přímé diagnostiky. Využívá molekulárně - biologické metody jako je in situ hybridizace, blottingové metody, PCR a jiné. Průkaz opět probíhá v mononukleárních buňkách periferní krve (Šejda et al., 1993).

#### 4.3.1. Plasma Viral Load

Tento test je znám také jako HIV NAAT (HIV nucleic acid amplification test). Výhodou tohoto testu je, že umožňuje stanovení HIV infekce i bez 2-3 týdenního okna, které potřebují testy sérologické. V podstatě se jedná o stanovení virové nálože (množství nukleové kyseliny viru) v krvi pomocí PCR (polymerase chain reaction) testu. Plasma viral load není užíván běžně, ale je velmi nápomocný při testování novorozenců, kteří mají matčiny protilátky i několik měsíců po porodu a není u nich možné provést testy založené na protilátkách. Také je užíván ve většině rozvinutých zemí ke screeningu HIV. Důvodem proč není tak často užíván je jeho finanční nákladnost, složitá administrativa a interpretace (**HIV testing, [online]**).

#### 4.3.2. Amplifikace RNA

Pomocí amplifikace RNA můžeme snížit diagnostické okno na 8 dnů. Tato metoda je pro použití v HIV diagnostice ve fázi výzkumů a je testováno pouze několik komerčních testovacích sad na dobrovolnících. Tato metoda byla zavedena v rámci nových metod, které mají být rychlé, levné, pohodlné a hlavně spolehlivé (**Diagnostika AIDS, [online]**).

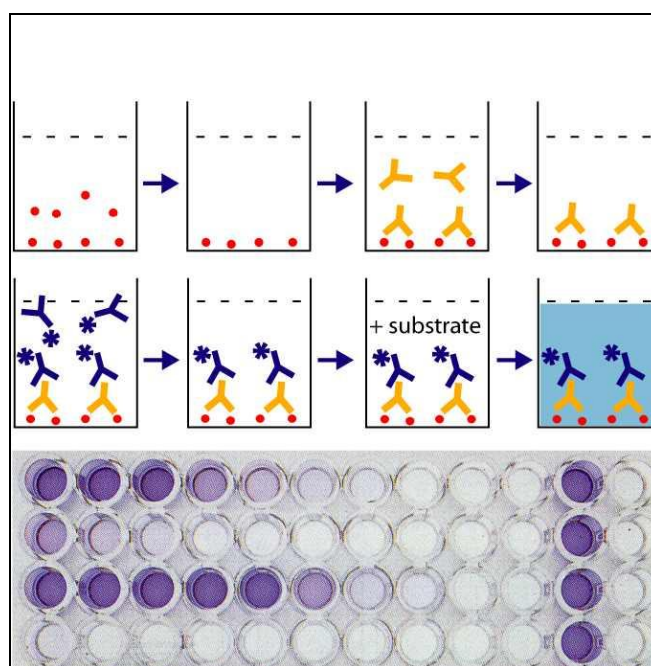
### 4.4. Nepřímá diagnostika

Nepřímá diagnostika se užívá pro běžnou mikrobiologickou diagnostiku a preventivní vyšetřování krevních dárců. Pokud jsou vhodně vybrané screeningové testy doplněny testy konfirmačními, dostaneme spolehlivé výsledky pro diagnostiku HIV i studium prevalence onemocnění v populaci (Šejda et al., 1993).

Nepřímá diagnostika je diagnostika pomocí detekce specifických protilátek. Patří sem výše zmíněné screeningové (EIA, aglutinační testy, cytochemické testy a rychlé orientační testy EIA) a konfirmační testy (Western blott, imunofluorescenční test, fytochemické testy a jiné), dále pak průkaz IgM protilátek (EIA, imunofluorescence), neutralizační protilátky a také cílená sérologie („site directed technology“) (Šejda et al., 1993).

#### 4.4.1. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Prvním testem při podezření na infekci HIV je ve většině případů ELISA (Diagnostika AIDS, [online]). ELISA je nejznámější metodou imunoenzymatických technik (EIA). „Imunoenzymatické postupy (enzyme immunoassay) vycházejí z toho, že na molekuly protilátek lze kovalentně navázat molekuly enzymu, aniž se poruší funkce enzymu či protilátek vázat antigen. Vybíráme si enzym, jenž katalyzuje vznik viditelného (zbarveného) produktu ze substrátu. Pak můžeme nejen prokázat přítomnost hledané reakční složky (antigenu nebo protilátky), ale stanovit i její množství (Votava, 2000).“



Obrázek 5 - ELISA

(Dostupné z:

[http://virus.usal.es/web/demo\\_microali/enterotoxina/imagenes/portada.jpg](http://virus.usal.es/web/demo_microali/enterotoxina/imagenes/portada.jpg))

K průkazu antiHIV protilátek se běžně užívá kompetitivní ELISA. Jamka mikrotitrační destičky je nejprve senzibilizován protilátkou, na tuto protilátku je teprve navázaný antigen a k tomuto antigenu se přidá vzorek s konjugátem proti antigenu. Protilátky přítomné ve vzorku s konjugátem soutěží o antigen. Pokud je tekutina v důlcích nezbarvena jedná se o pozitivní výsledek. Tedy o přítomnost protilátek antiHIV (Votava, 2000).

Výhodou metod ELISA je možnost automatizace, která umožní velké množství vyšetřených vzorků a univerzálnost (lze ji využít k detekci takřka všech mikrobů a prokázat protilátkovou aktivitu ve všech třídách imunoglobulinů). Pro infekci HIV je metoda HIV dokonce standardizována (**Votava, 2000**).

Existuje technika cílené sérologie, která pomocí EIA metod detekuje protilátky proti jednotlivým antigenním komponentům HIV. Využívá se přesně specifikovaných determinant pro EIA získanými chemickou syntézou nebo genovými manipulacemi a Western blotting (**Šejda et al., 1993**).

#### 4.4.2 Imunofluorescenční test

Podstatou imunofluorescenčního testu je imunofluorescence. Jedná se o sérologickou reakci s jednou složkou značenou fluorescenčním barvivem. Odečet výsledků probíhá pod fluorescenčním mikroskopem. Nepřímá fluorescence je jednou z nejčastějších forem této metody. Nepřímou fluorescenci lze použít k průkazu agens, ze kterých můžeme vytvořit preparát na podložním skle. Podobně jako u imunoenzymatických metod jí lze prokázat protilátky z různých tříd imunoglobulinů. Nevýhodou oproti imunoenzymatickým metodám je její pracnost, nemožnost automatizace, subjektivní odečítání výsledků a namáhání zraku. Protože tato metoda neumožňuje automatizaci a nedá se s ní tedy vyšetřit větší počet vzorků najednou, používá se spíše jako konfirmační test. Kromě diagnostiky HIV se používá jako konfirmační test v diagnostice syfilis (**Votava, 2000**).

#### 4.4.3. Western Blotting

Jedná se o molekulárně-biologickou techniku, která je v diagnostice HIV užívána jako konfirmační test při pozitivním nálezu HIV protilátek. „Purifikovaný HIV se nejprve rozdělí pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu na proteinové a glykoproteinové frakce lišící se molekulovou hmotností. Rozdělené frakce se pak elektroforeticky přenesou („přesají“) na nitrocelulóзовou membránu. Takto vzniklá replika virového elektroforegramu se rozstříhá na úzké pásy tak, aby každý pásek obsahoval všechny rozdělené frakce. Na pásy se pak nanášejí zkoumaná séra. Obsahuje-li vzorek protilátky proti HIV, navážou se jednotlivé antigeny v místě, kde pásek obsahuje příslušnou frakci. Navázané protilátky se pak dokážou imunoenzymaticky, pomocí konjugátu značeného např. peroxidázou a vhodného

substrátu. V pozitivním případě se na pásku objeví příčné barevné proužky. Každý proužek odpovídá přítomnosti protilátky proti příslušnému virovému antigenu. V případě protilátek proti HIV jsou diagnosticky průkazné proužky odpovídající frakcím označovaným podle hmotnosti v kilodaltonech jako p24, p31, gp41, gp120/ gp160 (**Votava, 2000**).“

Pomocí Western blottu lze prokazovat protilátky třídy IgM, a tedy ho použít k důkazu čerstvé infekce (**Votava, 2000**).

Western blott patří mezi konfirmační testy, to znamená testy zaměřující se na potvrzení reaktivního výsledku screeningových testů. Terénní laboratoř při reaktivitě vzorku metodami ELISA zasílá sérum ke konfirmaci do NRL pro HIV, hlásí reaktivitu vzorku ošetřujícímu lékaři. V NRL je provedena konfirmace reaktivity.

- V případě pozitivní reakce je vzorek prohlášen za pozitivní a hlášen zpět do laboratoře
- Pouze 2 % testů western blott jsou falešně pozitivní.
- Pokud je western blott negativní, hodnotíme to jako nepřítomnost infekce a jedinec je HIV negativní. Při tomto výsledku se doporučuje opakované testování. Je to důležité hlavně u lidí, kteří mají rizikové chování nebo žijí v rizikových skupinách. Je také možné, že je pacient zrovna v diagnostickém oknu a protilátky se ještě nemohou prokázat.
- Tento test může mít i neurčitý výsledek (detekce pouze některých protilátek nevyhovujícím pozitivitě), což může mít řadu příčin. V počátcích infekce se tvoří nedostatečné množství protilátek pro detekci, v pozdní fázi infekce nezachytíme protilátky proti jaderným proteinům. Někteří jedinci mohou vykazovat zkřížené reakce se specifickými HIV-1 peptidy nebo rekombinačními antigeny (**Diagnostika AIDS, [online]**).

#### 4.4.4 Virus neutralizační test

Neutralizační test se neuzívá k důkazu protilátek, ale k bližšímu určení virových izolátů. Pracnost a nákladnost vyvažuje vysoká specifita. Používají se neutralizační protilátky. Ty zbaví virus infekčnosti tím, že se na něj vyváží a k potvrzení dojde na vhodných vnímavých objektech (**Votava, 2000**). Jako vnímavý objekt mohou posloužit citlivé buněčné



linie. U HIV diagnostiky se užívá řada technik neutralizačních protilátek: neutralizace tvorby syncytií a plak - redukční techniky (Šejda et al., 1993).

#### 4.4.5. Rychlé testovací soupravy a domácí sady



**Obrázek 6 - Oraquick HIV – ½ test kit**

(Dostupné z:

[http://www.avert.org/apps/media\\_gallery/files/images/2288/oraquick-hiv-12-test-kit-web.jpg](http://www.avert.org/apps/media_gallery/files/images/2288/oraquick-hiv-12-test-kit-web.jpg))

Rychlé testy jsou založeny na principech běžného testování, jako jsou stanovení protilátek a antigenů nebo testy čtvrté generace. Výhodou je, že se vzorky k analýze nemusí zasílat do laboratoře, ale poskytnout výsledek do 20 minut. Není třeba vysoce proškoleného personálu, jejich použití je velmi snadné. Využívají jak krevních vzorků, tak slin a jsou stejně přesné jako laboratorní metody. Pokud je takovýto test reaktivní, potvrzuje se

konfirmačním testem (**HIV testing, [online]**).

Tyto testy zahrnují různé nosiče protilátek a antigenů jako je imunoassay nebo latexová aglutinační reakce a jsou využívány především v severoafrických zemích jako alternativa testu ELISA a Western blotu (**Diagnostika AIDS, [online]**).

V některých zemích je možné použít domácí testovací a vzorkovací sady. Se vzorkovací sadou si lidé mohou odebrat vzorek (nejčastěji krve) a poté ho sami zaslat do laboratoře na vyšetření. Během pár dní si zavolají pro výsledek, a pokud by vzorek byl pozitivní, zkušený personál poskytne další informace a podporu. Podle UNAIDS by tyto testy byly částečným řešením pro země, kde spousta lidí, žijících s HIV, nezná svůj status. Studie v Keni ukázaly, že lidi, kteří použili domácí testování a mají pozitivní výsledek, je pak jednodušší přesvědčit, aby zahájily léčbu (**HIV testing, [online]**).

Na druhou stranu existují i země, kde je zakázáno prodávat tyto domácí sady. Jedna z obav se týká výroby falešných testovacích setů, a také je nutné zajistit správnost a pravdivost takovýchto výsledků (**HIV testing, [online]**).

Pro terénní pracovníky a samotestování lze využít i neinvazivní testy využívající detekce IgG protilátek testem ELISA. Jako vzorky poslouží moč, sliny nebo vaginální sekret. Nevýhodou je nižší schopnost detekce. Naopak výhodou se zdá být menší riziko komplikací jak pro pacienta, tak personál a hlavně pohodlnost takového testování a vyšší ochota ke spolupráci u lidí z rizikových skupin (**Diagnostika AIDS, [online]**).



**Obrázek 7 - Neinvazivní domácí test HIV**

(Dostupné z: <http://www.test-kit-mart.com/products/std-test-kits/hiv-oral-test-kit2/>)

#### 4.5. Interpretace sérologických nálezů

Základem dobré a přesné diagnostiky je správná interpretace sérologických nálezů. Pozitivní nález antiHIV protilátek může mít dalekosáhlý dopad nejen na pacienta. Nicméně pokud opravdu nalezneme u jedince tyto protilátky, neznamená to ještě, že jedinec vyslechne diagnózu AIDS. Stejně tak negativní nález nemůže tuto diagnózu vyloučit. Hodnotitel musí brát také na vědomí, že průměrná doba nástupu protilátek může být odlišná od průměrné doby nástupu protilátek a všechna omezení diagnostické metody (**Šejda et al, 1993**).

Dle Šejdy et al. (**1993**) nález antiHIV protilátek neznamená diagnózu AIDS, ale stanoví, že vyšetřovaný:

1. je infikován HIV
2. je infekční a může infekci známými způsoby přenášet

3. v případě, že je bez klinických příznaků, není jasné, zda vůbec nebo za jak dlouho onemocní AIDS
4. má-li klinické příznaky onemocnění, nález antiHIV protilátek, potvrzuje diagnózu AIDS

Absence antiHIV protilátek znamená, že vyšetřovaný:

1. není infikován HIV
2. teoreticky může být infikován velmi krátce před vyšetřením (nedošlo ještě k sérokonverzi), a může být tedy infekční- nutno přihlídnout k epidemiologické anamnéze, event. Vyšetření opakovat, zejména u osob s vysokým rizikem infekce
3. může být v terminálním stádiu AIDS, kdy u některých nemocných klesají protilátky k neměřitelným hodnotám

Nejasný výsledek značí, že vyšetřovaný:

1. reaguje s některou z antigenních determinant HIV ve Western blotu, nespĺňuje však kritéria pozitivního nálezů HIV v tomto testu a nemůže být označen jako HIV pozitivní
2. pravděpodobně z nejrůznějších důvodů reaguje nespecificky s proteiny stejné molekulové hmotnosti, jakou vykazují některé proteiny HIV

U osob s nejasným nálezem je nutno vyšetření opakovat ve vzorku séra odebraném za 3-6 měsíců po prvním vyšetření. Osoby s nejasným nálezem se vyřazují s dárcovství krve, orgánů a spermatu.

## ZÁVĚR

Vývoj diagnostiky onemocnění virem HIV byl od objevu etiologického agens poměrně rychlý. Rozvoj nových diagnostických technik souvisí s rozvojem nových poznatků o viru HIV i metodách diagnostiky. Laboratorní diagnostika od osmdesátých let, kdy byl virus HIV objeven jako nové etiologické agens, výrazně pokročila.

I přes rozvoj nových diagnostických metod, centrální metody diagnostiky zůstávají stejné. Nejprve jsou stanoveny protilátky pomocí imunoenzymatických testů ELISA. Tyto výsledky jsou dále potvrzeny konfirmačními testy, jakým je třeba Western blotting. Je pravda, že imunoenzymatické testy prošly svým vývojem, to ale na principu stanovení moc nezměnilo. Měnil se pouze formát a snižovalo se diagnostické okno imunoenzymatických testů. Novými přístupy v diagnostice jsou rychlé testy a domácí testování. Určitá snaha je i v oblasti neinvazivních testů. Vždy je ale nutné zajistit správnou interpretaci výsledků.

Virus HIV stále zůstává velkou hrozbou pro celý svět. Dosud se nepodařilo objevit účinný lék, který by nemocným dal naději, že se vyléčí. Neexistuje také vakcína, která by umožnila prevenci v nejohroženějších skupinách lidí. Počet případů onemocnění i přes veškerou snahu stále narůstá.

Vývoj poznatků o HIV/AIDS a jeho diagnostice jde stále dopředu. Nestačí než doufat, že jednoho dne nalezneme účinnou léčbu tohoto zákeřného onemocnění, budeme mít vakcínu, která by zabránila rozvoji tohoto onemocnění a metody diagnostiky, které se budou nadále zlepšovat, aby byla diagnóza onemocnění možná, co nejdříve. Neustálá snaha odborníků v této oblasti mě utvrzuje o tom, že jednoho dne lidstvo to, jak se tohoto zákeřného viru zbavit. K tomuto cíli však vede ještě dlouhá cesta pokusů a omylů.

## **SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 - Antiretrovirotika .....	19
-------------------------------------	----

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Zralý virion HIV .....	11
Obrázek 2 - Šíření HIV v Africe .....	12
Obrázek 3 - Syncytium – Cytopatický efekt HIV .....	35
Obrázek 4 - Virus HIV pod elektronovým mikroskopem .....	36
Obrázek 5 - ELISA.....	38
Obrázek 6 - Oraquick HIV – ½ test kit .....	41
Obrázek 7 - Neinvazivní domácí test HIV .....	42

## SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 - Nové případy infekce HIV v České republice .....	23
Graf 2 - Osoby žijící s HIV/AIDS v České republice .....	22
Graf 3 - Rozdělení HIV pozitivních případů v ČR podle způsobu přenosu .....	24

# SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A DALŠÍCH ZDROJŮ

## Literatura

ANTONEN, Jaakko. Immunobiology of human immunodeficiency virus (HIV) infection. Tampere: University of Tampere, 1987, s. 17. ISBN 951-44-2126-4.

BENEŠ, Jiří et al. *Infekční lékařství*. 1.vyd. Praha: Galén, 2009, s. 148-159. ISBN 978-80-7262-644-1.

KONVALINKA, Jan – MACHALA, Ladislav. *Viry pro 21. století*. 1.vyd. Praha: Academia, 2011, s. 42-62. ISBN 978- 80-200-2021-5.

SYRŮČEK, Lubomír – ŠEJDA, Jan – TICHÁČEK Bohumil. *AIDS- syndrom získaného selhání imunity*, 1.vyd. Praha: Avicenum, 1986, s. 18-19.

ŠEJDA, Jan et al. *AIDS (syndrom získaného selhání imunity)*. 1 vyd. Praha: Ústav zdravotní výchovy, 1986, s. 7-10.

ŠEJDA, Jan et al. *Prevence, léčba a další aspekty nákazy HIV/AIDS*. 1 vyd. Praha: Galén, 1993, s. 12-53. ISBN 80- 85824-02-7.

VOTAVA, Miroslav, *Lékařská mikrobiologie II*. 1.vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2000, s. 84-222. ISBN 80-210-2272-8.

## Internetové zdroje

Antiretroviral drugs used in treatment of HIV infection [cit. 2013-08-07]

URL:

<<http://www.fda.gov/ForConsumers/byAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDSActivities/ucm118915.ht>>

BOSKEY, Elizabeth. *Nucleic Acid-Amplification Tests*[cit- 2013-08-07]

URL: < <http://std.about.com/od/M-O/g/Nucleic-Acid-Amplification-Tests.htm>>

Detailně o AIDS [cit. 2013-04-20]

URL: <<http://www.aids-hiv.cz/aids/prenos.html>>

Diagnostika AIDS [cit. 2013-07-17]

URL: <[http://www.wikiskripta.eu/index.php/Diagnostika\\_AIDS](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Diagnostika_AIDS)>

Epidemiologie AIDS [cit. 2013-07-13]

URL: <[http://www.wikiskripta.eu/index.php/Epidemiologie\\_AIDS](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Epidemiologie_AIDS)>

FREI, Jiří. *HIV/AIDS – problém týkající se nás všech* [cit. 2013-04-20]

URL: <<http://zdravi.e15.cz/clanek/sestra/hiv-aids-problem-tykajici-se-nas-vsech-459339>>

GALBRAITH, James W. *Fourth-Generation HIV tests* [cit. 2013-07-18]

URL:<<http://emedicine.medscape.com/article/1982802-overview>>

Global HIV and AIDS estimates [cit. 2013-04-07]

URL: < <http://www.avert.org/worldstats.htm> >

HIV diagnostic overview. [cit. 2013-07-18]

URL:<<http://www.rapid-diagnostics.org/rti-hiv-diag.htm>>

HIV Structure [cit. 2013-07-23]

URL: < [http://www.itg.be/internet/e-learning/written\\_lecture\\_eng/1\\_hiv\\_structure.html](http://www.itg.be/internet/e-learning/written_lecture_eng/1_hiv_structure.html)>

HIV testing [cit. 2013-07-17]

URL: <<http://www.avert.org/testing.htm>>

HUNT, Richard. *Human Immunodeficiency virus and AIDS – Life cycle of HIV* [cit. 2013-08-08]

URL:<<http://pathmicro.med.sc.edu/lecture/hiv7.htm>>

KAIN, Debra. *Adding Nucleic Acid Testing To HIV Screening May Help Identify More People of HIV*. [cit. 2013-07-18]

URL: < <http://ucsdnews.ucsd.edu/newsrel/health/06-15TestingHIV.asp> >

Léčba HIV a AIDS [cit. 2013-04-22]

URL: <<http://www.hiv.cz/showpage.php?key=lecba-hiv-a-aids>>

Podrobný popis HIV/AIDS [cit. 2013-04-20]

URL: <<http://www.aids-hiv.cz/popis.html>>

Prevence přenosu HIV [cit. 2013-05-02]

URL: < <http://www.hiv.cz/showpage.php?key=prevence>>



Protiepidemiologická opatření v ohnisku nákazy [cit. 2013-05-02]

URL:<[http://www.wikiskripta.eu/index.php/Protiepidemick%C3%A1\\_opat%C5%99en%C3%AD\\_v\\_ohnisku\\_n%C3%A1kazy](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Protiepidemick%C3%A1_opat%C5%99en%C3%AD_v_ohnisku_n%C3%A1kazy)>

STAŇKOVÁ, Marie. *Pozdní diagnostika HIV infekce* [cit. 2013-04-20]

URL: <<http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/pozdni-diagnostika-hiv-infekce-452987>>

Tisková zpráva Národní referenční laboratoře pro HIV / AIDS [cit. 2013-07-13]

URL:<[http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/HIV\\_AIDS/rocni\\_zpravy/2012/Tiskova\\_zprava\\_NRL\\_AIDS\\_20130128.pdf](http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/HIV_AIDS/rocni_zpravy/2012/Tiskova_zprava_NRL_AIDS_20130128.pdf)>

## **Prameny**

BRŮČKOVÁ, Marie. 30 let od popsání prvních případů AIDS: historie a současnost. *In Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie*, roč. 21, č.- 5. 2012, s. 190-194.

BRŮČKOVÁ, Marie et al. *Příručka HIV poradenství*, 2. vyd. Praha: Státní zdravotní ústav 2007, s. 2. ISBN 978-80-7071-294-8

*Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2012*. Ženeva: WHO Library Cataloguing – in – Publication Data, 2012. ISBN 978-92-9173-592-1.

CHAPPEL, Roderick J. -WILSON, Kim M. - DAX, Elizabeth M., Immunoassays for the Diagnosis HIV: Meeting Future Needs by Enhancing the Quality of Testing *In Future mikrobiologie*, Vol. 4 No. 8 2009, s. 963-982. Převzato z [www.medscape.com](http://www.medscape.com)