

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorský

Studijní obor: Biochemie a patobiochemie



MUDr. Daniela Dušková

Nastavení optimálního režimu vyšetřování markerů sledovaných
klinicky významných infekcí u dobrovolných dárců krve

Optimizing of the regime of marker's examination
of clinically important infections in blood donors

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce: prof. MUDr. Vladimír Tesař, DrSc, MBA, FASN

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze,

Podpis

Identifikační záznam:

DUŠKOVÁ, Daniela. *Nastavení optimálního režimu vyšetřování markerů sledovaných klinicky významných infekcí u dobrovolných dárců krve. [Optimalization of the regime of marker's examination of clinically important infections in blood donors].* Praha, 2014., 154 str., 9 příl.. Disertační práce (PhD.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika nefrologie Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1.lékařské fakulty, Fakultní transfuzní oddělení Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Vedoucí závěrečné práce: prof. MUDr. Vladimír Tesař, DrSc, MBA, FASN.

Poděkování

Děkuji panu profesorovi MUDr. Vladimíru Tesařovi, DrSc.,MBA, FASN za odborné vedení, podporu a cenné připomínky. Dále bych ráda poděkovala ing. Lukáši Darebníčkovvi za konstruktivní komentáře k mé práci a také mé rodině a přátelům za podporu v průběhu celého studia.

Abstrakt

Název práce: Nastavení optimálního režimu vyšetřování markerů sledovaných klinicky významných infekcí u dobrovolných dárců krve

Autor práce: MUDr. Daniela Dušková

Vedoucí práce: prof. MUDr. Vladimír Tesař, Dr.Sc., MBA, FASN

Tato disertační práce si klade za cíl přispět k diskuzi o rozšíření rutinního screeningového vyšetřování dárců krve v zařízeních transfuzní služby v České republice zavedením přímého vyšetřování vybraných infekčních agens molekulárně biologickými metodami.

V úvodu teoretické části je připomenut stručným pohledem do historie vývoj a přelomové události v transfuzní medicíně. Následuje část věnovaná problematice infekčních chorob souvisejících s transfuzí a obecným vyšetřovacím postupům používaným v transfuzní medicíně při výběru dárců krve. Závěr teoretické části je věnován stávajícím možnostem screeningových testů pro vyšetřování infekčních markerů u dárců krve, včetně přehledu postupů, které jsou používané v České republice, Evropské unii a dalších vybraných státech.

V praktické části je popsána prováděná studie, tj. screeningové vyšetřování souboru dárců krve rutinní vyšetřovací metodou (CMIA) a molekulárně biologickými metodami (RT-Real Time PCR) na přítomnost markerů HCV, HBV a HIV. Jsou popsány principy obou metod a vlastní postup vyšetřování v rámci studie. Je uveden souhrn naměřených dat, výsledků a nestandardních situací, které nastaly během studie a jejich hodnocení.

Výsledky jsou shrnuty v diskuzi.

V závěru jsou hodnoceny výstupy praktické části, jsou popsány návrhy možných variant screeningového vyšetřování infekčních markerů u dárců krve v České republice.

Klíčová slova: transfuze krve, vyšetřování infekčních markerů u dárců krve, HBV, HCV, HIV, přenos infekce transfuzí, potransfuzní reakce, dárci krve, CMIA, RT-Real Time PCR.

Abstract

Project title: Optimization of the regime of marker's examination of clinically important infections in blood donors

Project author: Daniela Dušková, M.D.

Project supervisor: prof. Vladimír Tesař, M.D., Dr.Sc., MBA, FASN

The aim of this project is to contribute to the discussion about introducing the methods of molecular biology into the routine blood donor testing in the transfusions departments in the Czech Republic.

The theoretical part includes a brief history and some turning points in transfusion medicine. The next part within the theoretical section is dedicated to the problems of infectious diseases concerning transfusion and the general examination processes used during the selection of blood donors. The end of the theoretical part concentrates on existing possibilities of markers' examination of clinically important infections in blood donors, including the list of processes performed in the Czech Republic, the European Union and other countries.

The practical part describes this study, ie. the routine screening test of blood donors using the CMIA method (a routine method) and using RT-Real Time PCR method (a molecular biology method) for detecting infectious markers (HCV, HBV, HIV). Within this part, the principle of both methods and the process of actual examinations are described in details. The data recorded during the examinations together with the results and non-standard situations are presented and discussed as well.

The final section summarises the outcomes, suggestions and possibilities for markers' examination of clinically important infections in blood donors in the Czech Republic.

Key words: blood transfusion, infectious markers testing of blood donors, HBV, HCV, HIV, transfusion transmitted infection, adverse transfusion reaction, blood donor, CMIA, RT-Real Time PCR.

Obsah

1	ÚVOD.....	4
2	HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE.....	6
2.1	ÚVOD DO PROBLÉMU	6
2.2	CÍL A HYPOTÉZY PRÁCE	6
3	STRUČNÁ HISTORIE KREVNÍ TRANSFUZE.....	8
3.1	NEJSTARŠÍ ZMÍNKY O KRVI	8
3.2	HISTORIE TRANSFUZE KRVE VE SVĚTĚ	9
3.3	HISTORIE TRANSFUZE KRVE V NAŠÍ ZEMI.....	13
4	VYŠETŘOVACÍ POSTUPY V TRANSFUZNÍM LÉKAŘSTVÍ.....	15
4.1	VYŠETŘOVACÍ POSTUPY V TRANSFUZNÍM LÉKAŘSTVÍ - ÚVOD DO PROBLEMATIKY	15
4.2	VÝBĚR DÁRCE KRVE	15
4.3	PŘEDODBĚROVÁ VYŠETŘENÍ.....	17
4.4	POODBĚROVÁ VYŠETŘENÍ (LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ ODEBRANÉ KRVE).....	22
4.4.1	<i>Vyšetření krevní skupiny a vyšetření screeningu nepravidelných antierytrocytárních protilátek.....</i>	<i>23</i>
4.4.2	<i>Vyšetřování markerů infekcí přenosných krví-transfuzí u dárců krve.....</i>	<i>24</i>
5	INFEKCE PŘENOSNÉ TRANSFUZÍ.....	26
5.1	PŘENOS INFEKČNÍCH AGENS	26
5.1.1	<i>Asymptomatické infekce</i>	<i>26</i>
5.1.2	<i>Přítomnost patogenu v krevním řečišti.....</i>	<i>27</i>
5.1.3	<i>Parenterální přenos patogenu</i>	<i>28</i>
5.1.4	<i>Přežívání patogenů po dobu skladování krve a jejích složek.....</i>	<i>28</i>
5.2	INFEKČNÍ AGENS PŘENÁŠENÁ TRANSFUZÍ	28
5.2.1	<i>Viry hepatitid</i>	<i>31</i>
5.2.2	<i>Retroviry</i>	<i>39</i>
5.2.3	<i>Herpes viry.....</i>	<i>41</i>
5.2.4	<i>Parvoviry</i>	<i>44</i>
5.2.5	<i>Flaviviry.....</i>	<i>45</i>
5.2.6	<i>Původci endogenní bakteriální kontaminace</i>	<i>46</i>
5.2.7	<i>Původci exogenní bakteriální kontaminace</i>	<i>51</i>
5.2.8	<i>Rickettsie</i>	<i>52</i>
5.2.9	<i>Protozoa.....</i>	<i>53</i>
5.2.10	<i>Priony.....</i>	<i>57</i>
6	SCREENING INFEKČNÍCH MARKERŮ U DÁRCŮ KRVE	59
6.1	LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA INFEKČNÍCH NEMOCÍ U DÁRCŮ KRVE – ÚVOD DO PROBLEMATIKY	59
6.2	VYŠETŘENÍ KREVNÍHO OBRAZU	60

6.3	PŘÍMÉ VYŠETŘOVACÍ METODY VYUŽÍVANÉ PRO SCREENING INFEKČNÍCH MARKERŮ U DÁRCŮ KRVE.....	60
6.3.1	<i>Polymerázová řetězová reakce (PCR)</i>	60
6.3.2	<i>Multiplexová polymerázová řetězová reakce (Multiplex PCR)</i>	63
6.3.3	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), Polymerázová řetězová reakce s využitím reverzní transkripce</i>	64
6.3.4	<i>TaqMan</i>	64
6.3.5	<i>Přímý průkaz patogenů v krevních elementech</i>	64
6.4	NEPŘÍMÉ VYŠETŘOVACÍ METODY VYUŽÍVANÉ PRO SCREENING INFEKČNÍCH MARKERŮ U DÁRCŮ KRVE.....	65
6.4.1	<i>Screeningové vyšetřovací metody s neoznačeným antigenem a/nebo protilátkou</i>	65
6.4.2	<i>Screeningové vyšetřovací metody s označeným antigenem a/nebo protilátkou</i>	66
6.4.3	<i>Enzymová imunoanalýza-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)</i>	67
6.4.4	<i>Kožní testy</i>	67
7	METODY POUŽÍVANÉ K VYŠETŘOVÁNÍ (SCREENINGU) DÁRCŮ KRVE VE SVĚTĚ	68
7.1	SCREENING INFEKČNÍCH MARKERŮ U DÁRCŮ KRVE V EVROPSKÉ UNII	68
7.2	SCREENING INFEKČNÍCH MARKERŮ U DÁRCŮ KRVE V USA	70
7.3	SCREENING INFEKČNÍCH MARKERŮ U DÁRCŮ KRVE V ČESKÉ REPUBLICE	70
7.4	DALŠÍ STÁTY	71
8	ROZŠÍŘENÍ STANDARDNÍHO REŽIMU VYŠETŘOVÁNÍ VIROVÝCH MARKERŮ U DÁRCŮ KRVE VE FAKULTNÍM TRANSFUZNÍM ODDĚLENÍ VŠEOBECNÉ FAKULTNÍ NEMOCNICE V PRAZE O NAT (NUCLEIC ACID TESTING)	73
8.1	POPIS VYŠETŘOVANÉHO SOUBORU	74
8.1.1	<i>Preanalytická fáze</i>	78
8.2	STANDARDNÍ VYŠETŘOVACÍ METODY - POPIS, POSTUP PRÁCE	82
8.2.1	<i>Popis použitých metod</i>	82
8.2.2	<i>Vyšetřování imunoanalytickými metodami – postup práce</i>	92
8.3	TESTOVÁNÍ MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÝMI METODAMI (NAT) - POPIS, POSTUP PRÁCE	94
8.3.1	POPIS POUŽITÉ METODY	94
8.4	PŘEHLED A INTERPRETACE NAMĚŘENÝCH DAT.....	109
8.4.1	<i>Výsledky testování první skupiny vzorků (č.1)</i>	109
8.4.2	<i>Výsledky testování druhé skupiny vzorků (č.2)</i>	120
8.5	DISKUSE	129
8.5.1	<i>Epidemiologická situace v České republice ve vztahu k transfuzní službě</i>	130
8.5.2	<i>Záchyt infekcí u dárců krve v České republice</i>	131
8.5.3	<i>Riziko přenosu infekce transfuzí v České republice</i>	133
8.5.4	<i>Souhrn výsledků testování infekčních markerů u dárců krve ve FTO VFN</i>	134
8.5.5	<i>Náklady na léčbu pacienta s hepatitidou B, hepatitidou C a s infekcí virem HIV</i>	136
8.5.6	<i>Odhad nákladů na testování infekčních markerů (HBV, HCV, HIV) u dárců krve metodou NAT v České republice</i>	136

8.6	ZÁVĚR	138
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A PRAMENŮ	142
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	149
	SEZNAM TABULEK	151
	SEZNAM OBRÁZKŮ	153
	SEZNAM GRAFŮ	154
	PŘÍLOHY	155
	PŘÍLOHA Č.1:	PŘÍKLAD DOKUMENTU S INFORMACEMI PRO DÁRCE KRVE
	PŘÍLOHA Č.2:	PŘÍKLAD DOTAZNÍKU DÁRCE KRVE
	PŘÍLOHA Č.3:	DALŠÍ TESTOVÁNÍ VZORKŮ REAKTIVNÍCH NA SYSTÉMU ARCHITECT i2000 V NÁRODNÍ REFERENČNÍ LABORATOŘI PRO VIROVÉ HEPATITIDY (VZOREK D.M.)
	PŘÍLOHA Č.4:.....	DALŠÍ TESTOVÁNÍ VZORKŮ REAKTIVNÍCH NA SYSTÉMU COBAS s201 V NÁRODNÍ REFERENČNÍ LABORATOŘI PRO VIROVÉ HEPATITIDY (VZORKY A.J., P.H., D.K., Ž.R., P.J., V.L., H.A.)
	PŘÍLOHA Č.5:.....	DALŠÍ TESTOVÁNÍ VZORKŮ REAKTIVNÍCH NA SYSTÉMU COBAS s201 V NÁRODNÍ REFERENČNÍ LABORATOŘI PRO AIDS (VZORKY A.J., P.H., D.K., Ž.R., V.L.)
	PŘÍLOHA Č.6:.....	TESTOVÁNÍ ARCHIVNÍCH VZORKŮ Z ODBĚRŮ DÁRCŮ REAKTIVNÍCH NA SYSTÉMU COBAS s201 V NÁRODNÍ REFERENČNÍ LABORATOŘI PRO VIROVÉ HEPATITIDY (VZORKY A.J., P.J., V.L.)
	PŘÍLOHA Č.7:..	VÝSLEDKY TESTOVÁNÍ OPAKOVANÝCH, POZITIVNĚ KONFIRMOVANÝCH DÁRCŮ Z NRL PRO VIROVÉ HEPATITIDY (VZORKY L.L., G.P., M.J., Š.M.)
	PŘÍLOHA Č.8:.....	PRIMÁRNÍ DOKUMENTACE ZE SYSTÉMU COBAS s201 PŘI TESTOVÁNÍ POSLEDNÍ SÉRIE VZORKŮ (INVALID BATCH)
	PŘÍLOHA Č.9:..	VÝSLEDKY TESTOVÁNÍ DRUHÉ SKUPINY VZORKŮ NA ÚKBLD VFN (VZORKY G.P., K.S., L.L., M.J., V.K.)

1 Úvod

Léčba krví (transfuzními přípravky) a krevními deriváty prošla od první publikované teorie krevního oběhu v polovině 17. století velmi zajímavým vývojem. O dvě století později lékaři stále při pokusech o zavedení transfuze krve do praxe naráželi na problémy spojené s aglutinací a hemolýzou v důsledku krevní inkompatibility. Dalším negativním jevem zůstával bezesporu také přenos různých infekčních chorob, ke kterému během transfuzí docházelo. Problém inkompatibility při transfuzích se podařilo na začátku 20. století vyřešit díky pracím Karla Landsteinerja a Jana Jánského, kteří rozdělili lidskou krev do skupin podle aglutinačních vlastností. Následoval prudký rozvoj transfuzní medicíny, založení první transfuzní služby a mnohé revoluční práce jako je např. popsání hemolytické choroby novorozence Lewinem a Stetsonem v polovině 20. století a další.

Dnes, na začátku 21. století, je transfuzní medicína samostatným (komplementárním) oborem a léčba krví se stává stále účelnější, cílenější a sofistikovanější. Vývoj v transfuzní medicíně nestagnuje a nové poznatky přináší především výzkum v oblasti imunohematologie. Jedním z problémů, který však přetrvává a naopak se stále globálnějším způsobem života nabývá na významu je, a to i navzdory našim znalostem biochemie, fyziologie a možnostem nových technologií, riziko přenosu infekce transfuzí. Proto je trvalou snahou specialistů v transfuzní medicíně nastavit takový screening vyšetření infekčních markerů u dobrovolných dárců krve, aby se riziko přenosu infekce minimalizovalo, a eventuálně, u některých klinicky významných infekcí, zcela vyloučilo.

Tato práce si klade za cíl přispět k diskuzi o rozšíření rutinního screeningového vyšetřování dárců krve v zařízeních transfuzní služby v České republice zavedením přímého vyšetřování vybraných infekčních agens molekulárně biologickými metodami.

V první, teoretické části práce, je představen stručným pohledem do historie vývoj a přelomové události v transfuzní medicíně. Následující kapitoly se detailním způsobem věnují problematice infekčních chorob z pohledu možného přenosu infekce transfuzí.

V teoretické části práce jsou dále popsány obecné vyšetřovací postupy používané v transfuzní medicíně při výběru dárců krve (předodběrové a poodběrové vyšetření), dále je uveden přehled a rozdělení všech infekčních agens, které lze z hlediska přenosu infekce transfuzí označit jako významné. Poslední kapitoly teoretické části se zabývají existujícími možnostmi screeningových testů (poodběrové vyšetření) pro dárce krve a přehledem konkrétních postupů, které jsou používány v České republice, Evropské unii a dalších vybraných státech.

Obsahem praktické části práce je popis prováděného experimentu – tedy screeningového vyšetřování souboru dárců krve molekulárně biologickými metodami (RT-Real Time PCR¹) na přítomnost markerů HCV², HBV³ a HIV⁴. Soubor dárců je získán sběrem vzorků z rutinního provozu ve Fakultním transfuzním oddělení Všeobecné fakultní nemocnice v Praze za předem definované období. Dárci jsou kromě metody RT-Real Time PCR vyšetřováni i standardní metodou CMIA⁵ používanou ve FTO VFN⁶ v Praze. RT-Real Time PCR je tedy používána jako doplňkové vyšetření v rutinním provozu.

Dále jsou popsány principy obou metod a vlastní postup práce, včetně použitého přístrojového vybavení. V dalších kapitolách praktické části je uveden souhrn všech naměřených dat, výsledků, dalších skutečností a nestandardních situací zjištěných během práce a jejich zhodnocení.

Závěr práce se věnuje celkovému hodnocení výstupů praktické části a navržení dalších možností vyšetřování resp. dalších experimentů tak, aby spolu s touto prací byl k dispozici materiál, který přispěje k rozhodnutí o doplnění stávajících vyšetřovacích metod o molekulárně biologické metody pro diagnostiku infekčních markerů u dárců krve na úrovni transfuzní služby v České republice.

¹ Polymerázová řetězová reakce v reálném čase s reverzní transkripcí

² Virus hepatitidy C

³ Virus hepatitidy B

⁴ Lidský virus imunitní nedostatečnosti

⁵ Chemiluminiscenční imunoanalýza na paramagnetických mikročásticích

⁶ Fakultní transfuzní oddělení Všeobecné fakultní nemocnice v Praze

2 Hypotézy a cíle práce

2.1 Úvod do problému

Prioritou projektu je přispět významným argumentem k diskuzi o zavedení efektivnějšího způsobu diagnostiky sledovaných infekcí (HIV, HBV, HCV) u dobrovolných dárců krve. V rámci studie doplní metoda RT-Real Time PCR stávající předepsanou metodu vyšetřování infekčních markerů u dárců krve (CMIA). Očekávaným přínosem zavedení metody RT-Real Time PCR v kombinaci se stávajícími vyšetřovacími technikami do rutinního provozu zařízení transfuzní služby je významné zkrácení diagnostického okna u infekcí HIV, HBV a HCV. Předpokladem je, že vhodný algoritmus vyšetřování dárců krve napomůže k včasnému odhalení latentních infekcí a sníží riziko přenosu infekce transfuzí.

2.2 Cíl a hypotézy práce

Primárním cílem práce je analýza snížení rizika přenosu infekce HIV, HBV a HCV transfuzí doplněním stávající vyšetřovací metody, která se používá při rutinním screeningu infekčních markerů (enzymoimunoanalytická metoda CMIA založená na reakci antigenu s protilátkou), o metodu molekulárně biologickou (metoda RT-Real Time PCR založená na testování virových nukleových kyselin). Tento nový vyšetřovací algoritmus je testován na reprezentativním vzorku populace dárců FTO VFN. Analýza vychází z předpokladu, že doplnění rutinního screeningu o molekulárně biologické testování povede k významnému zkrácení diagnostického okna při testování sledovaných infekcí.

Za potvrzení tohoto předpokladu budeme považovat situaci, kdy dárce v diagnostickém okně, který nejeví známky infekce a výsledky testování stávajícími metodami (CMIA) ve FTO VFN jsou negativní, bude při vyšetřování metodou RT-Real Time PCR označen jako reaktivní.

Dalším cílem práce je analýza praktických zkušeností při testování sledovaných infekčních markerů u dárců krve souběžně oběma metodami v provozu laboratoře FTO VFN a v neposlední řadě i analýza přínosu tohoto algoritmu testování infekčních markerů u dárců krve ve FTO VFN v Praze.

3 Stručná historie krevní transfuze

Péče o zdraví je stará jako lidstvo samo. Zdraví a nemoc, život a smrt jsou po celá tisíciletí předmětem studia doprovázeného snahou nemoci vyléčit a oddálit smrt. Transfuze krve jako jedna z léčebných možností poruch krvetvorby a krvácivých stavů má v medicíně neopominutelné místo.

V této kapitole jsou připomenuty významné momenty historie krevní transfuze od starověku po novodobou historii ve 20. století, kdy se transfuzní medicína stává samostatným medicínským oborem.

3.1 Nejstarší zmínky o krvi

Krev byla od nepaměti považována za nositelku života a tedy i proto je historie lékařství spojena s intuitivním nazíráním krve jako tekutiny mimořádného významu. Zmínky o léčebném využití krve nacházíme v historii lékařství již od nejstarších dob. Staří Egypťané věřili v posilující a omlazující účinek koupelí v krvi.⁽¹⁾

V antickém Řecku a Římě krev smývala vinu při obřadu zvaném taurobolium, spočívajícím v koupeli v krvi obětního býka. Při těchto slavnostech věřící vstoupil do jámy, která byla přikryta dřevěnými trámcí, mezi kterými byly ponechány mezery. Na trámovi byl zabit býk. Jeho krev stékala na obětujícího a tak z něho smývala jeho viny. Když vystoupil věřící potřísněný krví z jámy, byl spoluvěřícími zdraven jako člověk, který se zrodil do nového života. Byl renátus, znovuzrozený.⁽¹⁾

Názory starých Řeků a Římanů na úlohu krve v lidském těle vycházely z Hippokratovy humorální teorie čtyř tělních tekutin (5. stol. př.n.l.). Hippokrates pomocí poměru tělesných tekutin v organismu vysvětloval povahové vlastnosti a pochody, které se v organismu odehrávaly. Jednou takovou základní látkou pro něj byla i sanguis, krev.

Již staletí před naším letopočtem si lidé uvědomovali, že s krví uniká z těla i život. Ruku v ruce s tímto uvědoměním se objevovaly i pokusy dosáhnout pomocí krve uzdravení.

Ještě ve středověku považovali lidé pití krve za ozdravující a v dobových záznamech bylo často zaměňováno požití krve s transfuzí.⁽¹⁾

3.2 Historie transfuze krve ve světě

První „transfuze krve“ byla údajně provedena roku 1492 papeži Innocentovi III. Legenda vypráví, že papež byl dlouhodobě upoután na lůžko v somnolentním stavu po apoplektickém iktu. Postupně mu byla podávána krev tří desetiletých chlapců. Z historických pramenů není známo, zdali byla krev podána perorálně či nitrožilně, ale informace se shodují v tom, že chlapci zemřeli a papež také nebyl zachráněn.^(1,2)

Nepochybně významným pro počátky krevní transfuze bylo zavedení termínu cirkulace Andreou Cesalpinem (1519-1603). Ovšem teorii krevního oběhu v dnešním slova smyslu publikoval až v roce 1628 William Harvey ve svém díle *Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus*.

Další poznatky na poli krevní transfuze přinesl ve svém díle Francesco Folli z Florencie. Svou knihu o krevní transfuzi vydal roku 1654. Zajímavé je, že zřejmě tento zákrok nikdy sám v praxi neprovedl.⁽¹⁾

O dva roky později v roce 1656 prokázal anglický architekt a astronom Sir Christopher Wren v experimentech na psech systémové účinky různých látek injikovaných do jugulární žíly či tepny.

První dokumentovaná krevní transfuze na psech byla provedena Richardem Lowerem v roce 1665 a to propojením krkavice jednoho psa s jugulární žilou jiného psa.

Tímto úspěšným experimentem se nechal inspirovat francouzský filozof, matematik a fyzik Jean Babtista Denis, který patřil ke dvoru Ludvíka XIV., a který dne 15. června 1667 úspěšně provedl transfuzi ovčí krve patnáctiletému chlapci, vysílenému opakovanými venesekcemi prováděnými z důvodu horečnatých stavů.

V Anglii provedl první transfuzi Lower dne 23.11. 1667, kdy transfundoval krev placenému dobrovolníkovi Arthuru Cogovi.

Ve Francii Jean Babtista Denis pokračoval v podávání transfuze až do prosince 1667, kdy pacient, kterému opakovaně s úspěchem podal transfuzi, před plánovanou třetí transfuzí zemřel.

V souvislosti s tímto úmrtím, byl z podnětu členů Faculté de Medicin v Paříži vydán dekret, který označil transfuze krve provedené bez povolení lékařů fakulty za zločin. Tento dekret byl o deset let později z rozhodnutí parlamentu změněn na zákaz transfuzí, jenž se rozšířil po celé Evropě.

Zákaz transfuzí velmi oslabil zájem o transfuze na více než sto let a tím zpomalil vývoj lékařství v oblasti transfuzní medicíny. Další transfuze byly prováděny pouze sporadicky.^(1,2)

Průlom nastal až v roce 1818, kdy se „otec krevní transfuze“, londýnský porodník James Blundell ve snaze léčit porodní krvácení, uchýlil ke krevním transfuzím. Prováděl transfuze lidské krve a zachránil tak řadu životů. James Blundell popsal provedení krevní transfuze mezi lidmi 22.12.1818.

James Blundella následovala v provádění krevních transfuzí řada lékařů, kteří ale ve své klinické praxi naráželi na velmi často na překážky: aglutinaci a hemolýzu v důsledku krevní inkompatibility, infekce a srážení krve.⁽¹⁾

Na začátku 20. století byla publikována řada prací vedoucích k vyřešení základního problému krevních transfuzí, kterým byla inkompatibility krve v důsledku různých krevních skupin.

Průkopníkem v řešení tohoto problému byl rakouský lékař Karl Landsteiner. Karl Landsteiner rozdělil v roce 1900 krev podle aglutinačních vlastností do tří skupin, které označil A, B a C.^(3,4,5) V roce 1902 jeho žáci Alfred Decastello a Adriano Stürli popsali čtvrtou krevní skupinu. První, kdo správně rozdělil lidskou krev podle aglutinačních vlastností do čtyř krevních skupin, byl Jan Jánský. Tento český psychiatr a neurolog označil v roce 1907 ve své práci Hematologické studie u psychotiků (Études hematologiques, dans les maladies mentales) krevní skupiny římskými číslicemi I, II, III a IV v závislosti na jejich frekvenci. O tři roky později popsal v Baltimore nezávisle na Jánském čtyři krevní skupiny také Moss, který je však označil opačně IV, III, II a I.⁽⁵⁾

V roce 1912 zavedl Reuben Ottenberg termín „univerzální dárce“ a „univerzální příjemce“.⁽⁶⁾

Janského klasifikace krevních skupin byla široce užívána v Evropě, naproti tomu významná část USA lpěla na Mossově klasifikaci. Vzhledem k tomu, že užívání numerické klasifikace bylo spojeno s rizikem záměny a nebylo jednoznačně popisné, byla přijata na Kongresu Mezinárodní společnosti krevní transfuze v Paříži v roce 1937 klasifikace mezinárodní, která byla založena na Landsteinerově abecedním značení krevních skupin. Tato klasifikace byla vytvořena von Durgenem a Hirszfoldem. Porovnání výše uvedených nomenklatur je uvedeno v tabulce č.1.

Tabulka 1: Porovnání nomenklatur krevních skupin (ekvivalentní nomenklatury)⁷

Mezinárodní	Landsteiner	Jánský	Moss
AB	-	IV	I
A	A	II	II
B	B	III	III
0	C	I	IV

Dalším problémem, který bylo nutno překonat při aplikaci krevních transfuzí, bylo uchování krve v tekutém stavu a zabránění jejího srážení. Pokrok v této oblasti nastal v roce 1915, kdy Richard Lewisohn zavedl do klinické praxe citrátový roztok jako antikoagulans pro transfuzní účely. Tak se stala krevní transfuze procedurou nepřímou.⁽⁶⁾ Ve stejném roce zavedl Richard Weil metodu ochlazování a skladování krve. Až v roce 1943 byl zaveden do praxe Loutitem a Mollisonem ve Velké Británii antikoagulační roztok ACD (acid-citrát-dextróza).

První transfuzní službu na světě založil v roce 1921 v Londýně Percy Oliver, sekretář Camberwelské divize Britského červeného kříže. Jeho zásluhy byly oceněny v roce 1935 v Římě na prvním Kongresu Mezinárodní společnosti pro krevní transfuze, kde bylo oceněno, že dokázal již v roce 1921 vytvořit transfuzní službu nepřetržitě dostupnou, disponující zdravými dárci s ověřenými krevními skupinami. Ve svých počátcích musela rodící se transfuzní medicína překonávat řadu překážek.

⁷ Zdroj: DOBRÝ, E. *Historie krevní transfúze*. In: HRUBIŠKO, M., DOBRÝ E. *Základy hemoterapie*. Vydavatelství Osveta, 1974, s. 9-17

Mezi hlavní problémy patřila skutečnost, že mnohé nemocnice nebyly schopny provádět spolehlivou typizaci krevních skupin, což bylo příčinou opakovaných úmrtí v důsledku AB0 inkompatibility. Postupem času vznikaly registry dárců krve i bez vazby na Červený kříž a zdokonalovaly se různé aparatury k usnadnění přímého převodu krve, protože s nepřímým převodem se příliš nepočítalo.

Systémovým zlepšením situace nedostatku dárců, bylo založení krevní banky. První krevní banka byla založena roku 1932 v tehdejším Leningradu.⁽⁶⁾ V roce 1937 založil Bernard Fantus v Cook County Hospital v Chicagu krevní banku, kde byla krev skladována v lahvích a v chladnici.

Další rozvoj transfuzní služby nastal vlivem válečných událostí. Za občanské války ve Španělsku (1936–1939) lékaři konzervovali v lahvích krev krevní skupiny 0, protože tuto krevní skupinu bylo možno transfundovat komukoli.^(7,8)

V roce 1938 byl v Bristolu vytvořen vojenský sklad krevních zásob vedený doktorem Lionelem Whitbym. Britská armáda dávala přednost získávání dárců krve v týlu před rekrutováním dárců z bojujících vojáků. Nábor dárců mezi civilním obyvatelstvem byl úspěšný a koncem druhé světové války bylo odebráno více než tři čtvrtě milionu dárců. Po skončení druhé světové války byla v roce 1946 ve Velké Británii založena National Blood Transfusion Service.⁽⁵⁾

Bohužel i v oblasti krevní transfuze se objevovaly rasové předsudky. V průběhu druhé světové války byla pro německou armádu přijatelná pouze krev pocházející od zaručených dárců „árijské“ rasy. Princip rasové příslušnosti prosazoval i americký Červený kříž, který zakazoval použít krev od dárců černé pleti pro výrobu krevní plazmy a pro zpracování albuminu. Tento princip přetrvával v některých amerických státech až do konce 60. let 20. století.⁽⁹⁾

Závěrem nutno zdůraznit, že transfuzní služba v rozvinutých zemích vychází z ušlechtilé tradice dobrovolného dárcovství krve.

3.3 Historie transfuze krve v naší zemi

Na našem území provedl první převody krve A. Erpek., který pracoval s beránčí krví, v roce 1879. Tyto převody však byly provázeny těžkými reakcemi. Transfuze krve také studoval český profesor chirurgie v Innsbrucku a Vídni, E. Albert. A to nejprve na zvířatech a později aplikoval poznatky v praxi u vykrváčených. Své zkušenosti publikoval v roce 1879 a 1881. Jeho žák Karel Maydl jako první v Čechách začal provádět transfuze lidské krve. K rozvoji krevních transfuzí také významně přispěl v roce 1907 již zmiňovaný Jan Jánský určením čtyř krevních skupin.⁽⁹⁾

Vývoj transfuzního lékařství v našich zemích byl zpočátku úzce spjat s chirurgickými klinikami v Praze, Brně a dalších univerzitních městech.

Již v roce 1922 byla v sousedství operačních sálů I. chirurgické kliniky Fakultní nemocnice u svaté Anny v Brně takzvaná „ústředna dárců krve“. Zajišťování krevních transfuzí však záviselo pouze na iniciativě nadšených jednotlivců.

Proto v roce 1936 na sjezdu Československé chirurgické společnosti vyslovil profesor Podlaha požadavek, že „službu transfuze krve je nutno pečlivě a velkoryse organizovat“. Možnosti krevních transfuzí začali postupně využívat i internisté. V roce 1930 vydal E. Polák monografii Transfuze krve, v roce 1945 vydal M. Netoušek publikaci Krevní převod.⁽⁹⁾

Někteří lékaři již v meziválečném období prováděli krátkodobou konzervaci krve (J. Drbohlav, K. Holubec, J. Procházka, K. Sázavský, B. Voženílek). Tyto zkušenosti byly využity při mobilizaci v roce 1938, při Slovenském národním povstání, nebo při Květnovém povstání v Praze roku 1945.⁽⁹⁾

Jako dárci krve byli využíváni až do roku 1937 převážně příbuzní, v některých nemocnicích se dárci krve stávali i zaměstnanci nemocnic. Situaci částečně zlepšilo sdružování dárců krve do spolků, které za odměnu zajišťovaly požadavky nemocnic. V roce 1943 přešla organizace dárcovství krve do veřejné správy. Při dvaceti nemocnicích v Čechách a na Moravě byly zřízeny ústředny dárců krve, vedené lékařem. Každá nemocnice byla následně přidělena některé z těchto ústředí. Doporučovalo se, aby na každých 1 000 obyvatel byl 1 dárcem krve.^(7,9)

Transfuze krve začaly být na našem území plně využívány až po druhé světové válce. V roce 1948 byla zřízena na základě vládního usnesení Národní transfuzní služba. Na počátku byla zřízena síť 16 transfuzních stanic. Úkol náboru dárců krve převzal Československý červený kříž a spolek SAMARITA. Nábor dárců v té době odpovídal principům placeného dárcovství. Problematika bezplatného dárcovství se začala řešit až o mnoho let později. V roce 1952 byl založen Výzkumný ústav hematologie a krevní transfuze, který garantoval organizaci, metodiku, odbornost a výzkum v oblasti transfuzního lékařství.⁽⁷⁾

4 Vyšetřovací postupy v transfuzním lékařství

4.1 Vyšetřovací postupy v transfuzním lékařství - úvod do problematiky

Vyšetřovací postupy v transfuzním lékařství mají dva hlavní cíle. Prvním cílem je snaha zajistit bezpečnost dárce krve a krevních složek v průběhu odběru a v době po odběru, druhým cílem je vyrobít bezpečný transfuzní přípravek a to v předepsané kvalitě. Na tomto místě je třeba zdůraznit, že jak předodběrová, tak i poodběrová vyšetření dárce krve a krevních složek jsou zaměřena zejména na zjištění sledovaných klinicky významných infekcí přenosných krví resp. transfuzí. Krevní transfuzí lze přenést každou infekci, jejíž původce se vyskytne v krevním řečišti alespoň po krátkou dobu. Z praktického hlediska mají význam především ty 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.

4.2 Výběr dárce krve

Proces předodběrového vyšetření dárce krve a krevních složek je zahájen již výběrem vhodného dárce. Rada Evropy doporučuje a propaguje v oblasti dárcovství krve národní soběstačnost založenou na principech dobrovolného a bezpříspěvkového dárcovství. V Článku 2 v Doporučení č. R/95/14 je definováno dobrovolné a bezpříspěvkové dárcovství takto: „*Donation is considered voluntary and non-remunerated if the person gives blood, plasma or cellular components of his/her own free will and receives no payment for it, either in the form of cash, or in kind which could be considered a substitute for money.*“

This would include time of work other than that reasonably needed for the donation and travel. Small tokens, refreshments and reimbursements of direct travel costs are compatible with voluntary, non-remunerated donation.“(10)

Tedy: „Dobrovolnými bezplatnými dárci krve jsou ti, kteří dávají krev, plazmu nebo další součásti krve ze své vlastní svobodné vůle, aniž by za to dostali odměnu ve formě peněz nebo něčeho jiného, co může být považováno za ekvivalent peněz, např. čas z pracovní doby přesahující čas nezbytný na cestu k odběru, odběr samotný a cestu zpět.

Malé pozornosti, občerstvení a úhrada přímých cestovních výloh jsou s bezplatným dárcovstvím slučitelné.“ Výše uvedené principy dobrovolného a bezpříspěvkového dárcovství byly přijaty Radou evropského společenství (The Council of the European Communities) v Direktivě 2002/98 EC, v jejíž preambuli je stanoveno, že dobrovolné a neplacené dárcovství musí být vzato na vědomí tak, jak bylo definováno Radou Evropy. A dále v Článku 20, paragraf 1 stanovuje: „Member States shall take the necessary measures to encourage voluntary and unpaid blood donations with a view to ensuring that blood and blood components are in so far as possible provided from such donations.“(10) - tedy „Členské státy přijmou nezbytná opatření k podpoře dobrovolného a neplaceného dárcovství s cílem zajistit, aby krev a krevní komponenty byly získávány v co největší možné míře z dobrovolných a neplacených darování krve a krevních složek.“

V České republice propaguje a podporuje dobrovolné a bezpříspěvkové dárcovství krve a krevních složek tak, jak je definováno Radou Evropy, odborná Společnost pro transfuzní lékařství České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně spolu s Českým červeným křížem. Dárce by se tedy měl rozhodnout darovat krev a její složky dobrovolně a neočekávat ani nežádat za svůj dar finanční odměnu nebo protislужbu. Obecně řečeno stát se dárce krve může každý zdravý muž nebo žena ve věku 18 až 65 let. Efektivní výběr vhodného dárce krve a krevních složek v mnoha ohledech závisí na dobré komunikaci mezi zařízeními transfuzní služby a/nebo odběrovými centry a potenciálními dárci krve.

Aby byl transfuzní přípravek pro pacienta co nejbezpečnější, a to zejména s ohledem na přenos infekce transfuzí, je nutné poskytnout ještě před odběrem potenciálnímu dárci krve všechny nezbytné informace o průběhu odběru, o možnostech a metodách testování chorob přenosných transfuzí a také o rizikových faktorech a chování, které u něj zvyšují riziko onemocnění AIDS⁸ a dalších infekcí.

V neposlední řadě musí být dárce informován o možnosti samovyloučení z dárcovství, kterou má kdykoli v rámci celého procesu darování krve a krevních složek. Kdykoli po odběru nebo v průběhu odběru má dárce možnost také požádat o to, aby transfuzní přípravky z jeho odběru nebyly použity pro klinické účely nebo pro frakcionaci, a to bez udání důvodu.⁹

4.3 Předodběrová vyšetření

Předodběrové vyšetření potenciálního dárce krve a krevních složek je proces, na jehož konci je rozhodnutí o propuštění nebo nepropuštění dárce k odběru, jeho výsledkem může ale také být rozhodnutí o trvalém vyloučení z dárcovství.

Smyslem předodběrových vyšetření tedy je:

- a) zjistit, zda-li odběr samotný nemůže zhoršit aktuální zdravotní stav potenciálního dárce,
- b) zjistit, jsou-li sledované parametry krevního obrazu potenciálního dárce vyhovující pro to, aby transfuzní přípravek/přípravky vyrobené z jeho odběru následně splňovaly požadavky na kvalitu.
- c) zjistit, není-li z hlediska přenosu infekce transfuzí odběr od tohoto dárce klasifikován jako rizikový.

⁸ Acquired Immune Deficiency Syndrome

⁹ Příklad dokumentu s informacemi pro dárce krve viz příloha č.1, příklad dotazníku dárce krve viz příloha č.2

Minimální požadavky na předodběrové vyšetření jsou dány aktuální legislativou (na konci roku 2011 je to vyhláška č. 143/2008 Sb. O lidské krvi).

V rámci předodběrových vyšetření se jako první krok provádí vyšetření krevního obrazu potenciálního dárce krve. Sledují se především výsledky měření hematokritu, koncentrace hemoglobinu a počet leukocytů. Limity jsou shrnuty v tabulce č.2:

Tabulka 2: Minimální požadavky výsledků předodběrového vyšetření¹⁰

Minimální hodnoty předodběrového vyšetření		
	muži	ženy
HCT ¹¹ [%]	≥40	≥38
HB ¹² [g/l]	≥135	≥125
LEU [x10E9/l]	≤10	≤10
PLT [x10E9/l]	≥150	≥150
HB[g/l]/HCT [%]	≥140/42	≥140/42

Minimální a maximální koncentrace leukocytů stanovena vyhláškou není, ale v praxi jsou akceptovány hodnoty v rámci fyziologických mezí. Abnormálně vysoké nebo nízké hodnoty koncentrace hemoglobinu a/nebo počtu leukocytů by měly být vždy dále vyšetřeny na hematologickém pracovišti. Stejně tak by měl být vyšetřen pokles koncentrace hemoglobinu o více než 20g/l mezi dvěma úspěšnými, po sobě jdoucími odběry plné krve.

Dalším krokem předodběrového vyšetření dárce krve je zhodnocení osobní anamnézy a posouzení jeho aktuálního zdravotního stavu. Protože se dárce krve může stát pouze zdravý člověk, u něhož ani události v anamnéze ani životní styl neznamení riziko zdravotních komplikací v průběhu odběru ani v období po odběru a současně nezvyšují riziko přenosu infekce transfuzí, byla stanovena pravidla nejen pro přijetí, ale také pro trvalé a dočasné (při dočasném vyřazení je stanovena doba, po kterou nemůže potenciální dárce krev ani krevní složky darovat) vyloučení z dárce.

Důvody k trvalému a dočasnému vyloučení z dárce krve a krevních složek nelze vyjmenovat všechny, proto níže uvádím alespoň jejich základní přehled.

¹⁰ Zdroj: vlastní zpracování dle Vyhlášky 143/2008Sb

¹¹ Hematokrit

¹² Hemoglobin

Důvody, které vedou k trvalému vyloučení z dárcovství krve a krevních složek

- a) HIV/AIDS – k trvalému vyloučení vede jak onemocnění AIDS, tak i potvrzená pozitivita nebo indeterminate (nejasný) výsledek vyšetření HIV 1,2 z Národní referenční laboratoře pro AIDS. Dále opakovaná reaktivita¹³ anti-HIV 1,2 a p24 HIV screeningových testů z různých odběrů a v neposlední řadě i skutečnost, když je sexuálním partnerem potenciálního dárce jedinec HIV pozitivní.
- b) Hepatitida B – k trvalému vyloučení vede informace o prodělaném onemocnění v anamnéze, dále pozitivita HBsAg, pozitivita HBeAg, prokázané protilátky anti-HBe, prokázané protilátky anti-HBc a pozitivita HBV-DNA. Stejně tak vede k trvalému vyloučení i skutečnost, když je sexuálním partnerem potenciálního dárce jedinec s prokázanou infekcí virem hepatitidy B.
- c) Hepatitida C – k trvalému vyloučení vede klinické onemocnění hepatitidou C, nález protilátek anti-HCV, nález HCVAg, nález HCV-DNA.
- d) Vrozená syfilis je dalším důvodem k trvalému vyloučení z dárcovství.
- e) HTLV I a II – důvodem k trvalému vyloučení je jak onemocnění infekcí virem HTLV I a II, tak i nález protilátek anti-HTLV I a II.
- f) Creutzfeld–Jacobova choroba nebo jiná spongiformní encephalopathie – důvodem k trvalému vyloučení dárce je onemocnění dárce nebo výskyt choroby v rodině. K trvalému vyloučení vede i podezření na onemocnění u dárce nebo některého z rodinných příslušníků. Dále jsou vyloučeny i jedinci, kteří pobývali po dobu šesti a více měsíců ve Velké Británii nebo ve Francii v letech 1980 až 1996 a také jedinci, kterým byla po roce 1980 ve Velké Británii nebo ve Francii podána transfuze krve nebo krevních složek.
- g) Trvale jsou z dárcovství vyloučeni i jedinci, kteří byli v minulosti léčeni výtažky z lidské hypofýzy a příjemci štěpů.
- h) Stejně tak jsou trvale vyloučeni z dárcovství jedinci, jejichž sexuální partner je léčený koncentráty koagulačních faktorů.

¹³ Opakované vyšetření: vyšetření téhož vzorku stejným postupem ve dvojici v 1 sérii nebo jednotlivě ve 2 následujících sériích. Provádí se při reaktivitě nebo u hraničního výsledku vstupního vyšetření. Opakovaně reaktivní (zahrnuje i opakovaně hraniční): opakování vyšetření z téhož vzorku=2x reaktivní/hraniční nebo 1x reaktivní + 1x hraniční nebo 1x reaktivní/hraniční + 1x negativní.

- i) Jedinci s chronickým onemocněním zažívacího traktu, např. s colitis ulcerosa, chronickým onemocněním jater nebo slinivky, po resekci žaludku nebo po rozsáhlé resekci střev nemohou být také akceptováni jako dárce krve.
- j) Epilepsie, astma bronchiale a dokumentovaný anafylaktický stav patří také ke klinickým situacím, které jedinci stát se dárce krve a krevních složek neumožní.
- k) Alkoholismus a i.v. užívání drog se také běžně řadí k důvodům trvalého vyloučení z dárcovství. Stejně tak nejsou jako dárce krve obvykle akceptováni ani kuřáci marihuany, ani další jedinci, jejichž životní styl nese vysoké riziko přenosu infekce transfuzí. Mezi tyto jedince patří všichni ti, kteří jsou promiskuitní, provozují sex za peníze nebo za drogy nebo jejichž sexuální partner vykazuje uvedené rizikové známky chování. V neposlední řadě jsou trvale vyřazeni z dárcovství krve a krevních složek muži, kteří provozují sex s muži nebo ženy, jejichž sexuální partner provozuje sex s muži.
- l) Léčba maligních onemocnění, chronických zánětlivých onemocnění a systémových onemocnění jako je např. SLE (systémový lupus erythematoses) a poruchy krvetvorby jsou také důvody k trvalému vyloučení z dárcovství.

Důvody, které vedou k dočasnému vyloučení z dárcovství krve a krevních složek

- a) Pylová alergie a senná rýma vylučují jedince z dárcovství v období alergických projevů a/nebo při desenzibilizační medikaci.
- b) Rozsáhlý ekzém je důvodem k vyloučení pokud jsou eflorescence i v místech, kde se provádí venepunkce, nebo v době léčby.
- c) Jedinci trpící psoriasou jsou vyloučeni z dárcovství v případě rozsáhlých postižení včetně míst venepunkce, aktivitě ložisek a probíhající terapii.
- d) Vředová choroba gastroduodenální je důvodem vyloučení z dárcovství po dobu nejméně 6 měsíců po ukončení terapie.
- e) Onemocnění hepatitidou A, získaná syfilis a kapavka vylučují jedince z dárcovství po dobu jednoho roku po vyléčení. Na tomto místě je třeba zdůraznit, že onemocnění syfilis nebo kapavkou může být známkou rizikového promiskuitního chování potenciálního dárce krve.

- f) Antropozoonózy jako je borelióza, listerióza, a tularémie jsou důvodem k vyloučení z dárcovství po dobu dvou let od vyléčení. Po prodělané toxoplazmóze, břišním tyfu a paratyfu nesmí jedinec darovat krev ani krevní složky po dobu šesti měsíců od vyléčení.
- g) Infekční mononukleóza je po vyléčení důvodem k ročnímu odkladu darování krve a krevních složek.
- h) Plicní tuberkulóza vylučuje jedince z dárcovství po dobu 2 let od vyléčení.
- i) Pobyt v tropech a subtropích vzhledem k možnému riziku onemocnění tzv. tropickými a v České republice neobvyklými chorobami, jako je např. malárie, babesiosa, Chagasova choroba, leishmanióza, Kala Azar, Q-horečka a v neposlední řadě i onemocnění způsobené virem západonilské horečky (WNV – West Nile Virus) je důvodem k vyloučení z dárcovství po dobu šesti měsíců; pokud potenciální dárce pobýval v oblasti, kde se vyskytlo onemocnění, jehož původcem je West Nile Virus, nesmí darovat krev a krevní složky po dobu 28 dní.
- j) Po krátkou dobu, obvykle po dobu jednoho až dvou týdnů, nejsou akceptováni jako dárce krve a krevních složek jedinci vykazující známky nachlazení nebo po prodělané viróze.
- k) Mezi důvody, které vedou k dočasnému vyloučení z dárcovství krve a krevních složek je třeba uvést i tetování, akupunkturu a piercing, které vylučují potenciálního dárce z dárcovství po dobu šesti měsíců.

Nedílnou součástí procesu předodběrových vyšetření a posouzení způsobilosti potenciálního dárce k odběru je i fyzikální vyšetření. Provádět u každého potenciálního dárce před odběrem kompletní lékařské a fyzikální vyšetření není v praxi možné. Obvykle je možné pouze posoudit vzhled dárce, odebrat anamnézu a zkontrolovat výsledky vyšetření krevního obrazu. Vlastní fyzikální vyšetření je omezeno na posouzení habitu, stavu pokožky (stopy po i.v. aplikaci drog; icterus, pletora apod.), změření tělesné teploty, tlaku krve a změření a posouzení pulsu.

Zejména před dárcovskými aferézami je třeba získat i přesný údaj o tělesné hmotnosti. Minimální akceptovatelné výsledky fyzikálního vyšetření jsou uvedeny v tabulce číslo 3.

Tabulka 3: Minimální akceptovatelné výsledky fyzikálního vyšetření dárce¹⁴

Minimální akceptovatelné výsledky fyzikálního vyšetření dárce	
Tělesná teplota	max. 37°C
Puls	50 – 100 tepů/min.
Systolický TK ¹⁵	max. 180 mm sloupce rtuti
Diastolický TK	max. 100 mm sloupce rtuti
Hmotnost	min. 50 kg
Hmotnost (pro aferetické odběry)	min. 60 kg

Z výše uvedených a z dalších skutečností (posouzení laboratorního vyšetření, fyzikální vyšetření), které je nutné zohlednit před rozhodnutím o propuštění nebo nepropuštění potenciálního dárce k odběru, je zřejmé, že velmi záleží na vědomostech, zkušenosti a v neposlední řadě i zodpovědnosti posuzujícího lékaře.

4.4 Poodběrová vyšetření (laboratorní vyšetření odebrané krve)

Laboratorní testování darované plné krve nebo jejích složek zahrnuje vyšetření krevní skupiny v ABO systému, znaku RhD, vyšetření screeningu nepravidelných antierytrocytárních protilátek a v neposlední řadě vyšetření markerů sledovaných, klinicky významných infekcí přenosných krví-transfuzí. Tato vyšetření se v zařízeních transfuzní služby obvykle provádí z organizačně technických důvodů až po odběru krve nebo jejích složek.

¹⁴ Zdroj: vlastní zpracování dle Vyhlášky 143/2008Sb

¹⁵ Tlak krve

Další testy, jako je vyšetření CMV¹⁶, HLA¹⁷, vyšetření antileukocytárních a antitrombocytárních protilátek, vyšetření koncentrace IgA¹⁸ v plazmě, typizace dalších erytrocytárních antigenů jsou možností volby.

4.4.1 Vyšetření krevní skupiny a vyšetření screeningu nepravidelných antierytrocytárních protilátek

Vyšetření krevní skupiny v AB0 systému, znaku RhD, vyšetření screeningu nepravidelných antierytrocytárních protilátek včetně tištěné informace o krevní skupině na identifikačním štítku transfuzního přípravku má nepřehlédnutelný význam, protože většina fatálních nežádoucích reakcí po transfuzi, zejména akutní hemolytická reakce způsobená podáním inkompatibilního transfuzního přípravku v AB0 systému, je důsledkem administrativní chyby v rámci procesu podání transfuze. U dárců krve a krevních složek musí být vyšetření krevní skupiny provedeno u každého odběru.

Metoda vyšetření krevní skupiny v AB0 systému a vyšetření znaku RhD je založena na principu přímé aglutinace, kdy jsou neznámé antigeny vyšetřovány pomocí známých komerčních diagnostických antisér a neznámé pravidelné protilátky jsou vyšetřovány pomocí známých komerčních diagnostických erytrocytů. Výsledek vyšetření krevní skupiny v systému AB0 a znaku RhD musí být nezávisle ověřen.

Vyšetření screeningu nepravidelných antierytrocytárních protilátek se provádí metodou nepřímého antiglobulinového testu, kdy testujeme plazmu nebo sérum dárce proti komerčním screeningovým erytrocytům se známou antigenní skladbou.

Dárce krve nebo jejích složek se může stát pouze jedinec, který nemá v plazmě přítomny nepravidelné antierytrocytární protilátky.

16 Cytomegalovirus

17 Human Leucocyte Antigen

18 Imunoglobulin A

4.4.2 Vyšetřování markerů infekcí přenosných krví-transfuzí u dárců krve

Algoritmus vyšetřování dárců krve s ohledem na přenos klinicky významných infekcí transfuzí je výsledkem strategického rozhodnutí, jehož cílem je maximálně snížit riziko přenosu infekce transfuzí. Týká se tedy zejména spektra infekcí, které mají být u dárců krve testovány a pochopitelně i výběru k tomu účelu vhodných testů. Toto rozhodnutí by mělo být založeno na komplexním posouzení rizika přenosu infekce transfuzí v daném regionu, to znamená, že při nastavení algoritmu vyšetřování infekčních markerů u dárců krve je třeba vzít v úvahu prevalenci klinicky významných infekcí přenosných transfuzí v dané populaci dárců krve a na základě toho vybrat vhodný test k vyšetření té, které infekce.

Výsledný algoritmus screeningu infekčních markerů u dárců krve obvykle vychází z místní epidemiologické situace, ale musí také zohledňovat rizika extrateritoriálních, tj. cestovatelských infekcí. V praxi to znamená, že do screeningu infekčních chorob by měly být zařazeny i testy na „exotické infekce“, nebo že musí být dárce dočasně vyřazen na dobu, která odpovídá inkubační době dané infekce.

Výběr vhodného testu je zásadní, protože testy, které velmi dobře vyhovují při testování pacientů, se mohou chovat jinak, pokud jsou využívány k testování dárců krve. Můžeme například považovat za výborný test se specifitou¹⁹ 99,9%, ale je třeba si uvědomit, že 0,1% výsledků bude pozitivních falešně²⁰. Pokud je takovýto test prováděn např. na 12 milionové populaci dárců krve, tak bude mít 12000 vyšetřovaných jedinců výsledek pozitivní (reaktivní). V případě, že bude test využíván k vyšetření infekce s velmi nízkou incidencí, např. 1:500 000 v populaci dárců krve, tak pouze u 24 lidí (z uvedené 12-ti milionové populace dárců) bude diagnostikováno nosičství infekce, na kterou byli testováni. To znamená, že i s užitím uvedeného vysoce citlivého testu může být 11976 jedinců falešně považováno a označeno za infekční.^(13,14)

¹⁹ Specifita: vyjadřuje schopnost testu přesně vybrat případy, u nichž zkoumaný znak nenastává (specifita=počet skutečně negativních/(počet skutečně negativních + počet falešně pozitivních).
Senzitivita: vyjadřuje úspěšnost, s níž test zachytí přítomnost sledovaného stavu u daného subjektu (senzitivita=počet skutečně pozitivních/(počet skutečně pozitivních+počet falešně negativních).

²⁰ Biologická falešná pozitivita (biologicky falešně pozitivní reakce): je stav, kdy protilátky nevznikají pouze jako odpověď na tu, kterou (testovanou) infekci, ale také jako důsledek mnoha jiných stavů infekční a neinfekční povahy.

Pokud jsou vybrané testy založeny na průkazu protilátek proti původcům infekcí, může být problémem i tzv. „window perioda“. Window perioda je časový úsek, kdy je jedinec již infekční, ale screeningové testy jsou ještě negativní. Proto je vhodné využívat k testování dárců krve komerční testy s garancí co nejkratší window periody a event. zvážit implementaci testování nukleových kyselin u vybraných infekcí.

Nezanedbatelnou roli při výběru vhodných vyšetřovacích metod hraje i cost&benefit, protože ekonomický dopad testování infekčních markerů u statisíců (a v některých zemích i milionů) jedinců je také třeba při rozhodování zohlednit.

V neposlední řadě je rozhodování o nastavení algoritmu vyšetřování infekčních markerů u dárců krve téměř vždy ovlivněno i situací politickou, sociální a etickými standardy v dané zemi nebo regionu.

V současné době není ani na světě ani v Evropě úplná jednota týkající se mandatorního stanovení spektra infekcí vyšetřovaných u dárců krve. Avšak prakticky celosvětová shoda panuje v názoru na vyšetřování tří, z transfuzního hlediska nejzávažnějších virových infekcí: HIV, hepatitidy B (HBV) a hepatitidy C (HCV).

5 Infekce přenosné transfuzí

Infekcím získaným v důsledku podání transfuze krve nebo jejích složek věnuje laická veřejnost a zejména pacienti, pro něž podání transfuze představuje riziko infekce, velkou pozornost. Důvodem je zejména strach z AIDS. Infekce virem HIV není však zdaleka jedinou infekcí, jejíž původce je přenosný krví, tedy i transfuzí.

Tato kapitola je věnována patogenům, které lze transfuzí přenést, jejich popisu a současným možnostem diagnostiky.

5.1 Přenos infekčních agens

Aby bylo možné přenést krví a jejími složkami v průběhu transfuze infekci, musí být původci těchto infekcí vybaveni takovými schopnostmi, aby přežili během celého procesu výroby transfuzního přípravku, tedy období počínající odběrem krve nebo jejích složek, jejich zpracování a konečně skladování. V neposlední řadě je nutno zmínit skutečnost, že tyto patogeny obvykle v časném stádiu infekce nevyvolávají klinické symptomy onemocnění.

5.1.1 Asymptomatické infekce

Aby bylo možno přenést infekci transfuzí krve nebo jejích složek, musí být infekční agens schopno dát vzniknout asymptomatické infekci u potenciálního dárce krve. Dárce krve se tak stává infekčním nebo potencionálně infekčním.⁽¹⁵⁾

5.1.2 Přítomnost patogenu v krevním řečišti

Infekční agens musí být přítomno v krevním řečišti v čase darování krve nebo jejích složek a to v infekční nebo v potencionálně infekční formě. Pokud je tato podmínka splněna, je možno infekci transfuzí přenést.

Patogeny přenosné krví jsou buď volné v plazmě nebo v leukocytech ve formě infekčních virionů nebo ve formě latentní. V neposlední řadě lze přenést infekční agens v erytrocytech.⁽¹⁵⁾

5.1.2.1 Volné patogeny přenosné v plazmě

Některé viry, bakterie a protozoa přenesené volné v plazmě mohou buď přímo infikovat další tkáň nebo jsou přítomny v plazmě v období části životního cyklu, kdy je infekční agens uvolněno z infikovaných tkání do krve.⁽¹⁵⁾

5.1.2.2 Patogeny přenosné v leukocytech

V leukocytech mohou být přenášené buď volné viriony nebo latentní formy virů integrované do buněčné nukleové kyseliny. V některých případech může být infekční agens přítomno v obou formách, ale v různých stádiích infekciozity. Infekční agens v latentní formě mohou být přítomna dokonce i v přítomnosti specifických neutralizačních protilátek.⁽¹⁵⁾

5.1.2.3 Patogeny přenosné v erytrocytech

Některé protozoární infekce mají fázi, kdy je infekční agens přítomno v erytrocytech. V tomto období infekční agens obvykle dozrává do další fáze svého životního cyklu, kdy je z erytrocytů uvolněno.⁽¹⁵⁾

5.1.3 Parenterální přenos patogenu

Obecně se považují za infekce přenosné transfuzí pouze ty, jejichž původci se přenášejí parenterálně. Avšak výjimky k tomuto předpokladu existují. Např. byl oznámen přenos hepatitidy A transfuzí, ačkoli původce onemocnění (virus hepatitidy A) se řadí mezi enteroviry přenášené orofekální cestou.⁽¹⁵⁾

5.1.4 Přežívání patogenů po dobu skladování krve a jejích složek

Krev a její složky – transfuzní přípravky a krevní deriváty se skladují v různých fyzikálních skupenstvích (např. plná krev, plazma, vysoce koncentrované roztoky proteinů, lyofilizované produkty) a při různých teplotách (od minus 25°C do plus 24°C).⁽¹⁵⁾

Aby byl patogen schopen infikovat příjemce transfuze (krve, transfuzních přípravků nebo krevních derivátů) musí být schopen přežít podmínky nastavené pro výrobu a zejména pro skladování transfuzních přípravků a krevních derivátů. Skladování transfuzních přípravků a krevních derivátů jsou schopné přežít viry, zejména neobalené viry jako je např. virus hepatitidy A a Parvovirus B19. Skladování mohou přežít také bakterie, ale vážné nežádoucí reakce u příjemce transfuze jsou spíše než bakteriemi samotnými způsobeny bakteriálními endotoxiny, které jsou z bakterií uvolňovány po zániku bakterií během doby skladování transfuzního přípravku.

5.2 Infekční agens přenášená transfuzí

Je prokázáno, že transfuzí lze přenést viry, bakterie, protozoa a priony. Přenesení prionů transfuzí bylo a je hojně diskutováno, ale někteří autoři se i přes pochybnosti již ve svých pracích přiklánějí k názoru, že přenos prionů transfuzí je možný.⁽¹⁶⁾

Je pochopitelně nemožné uvést úplný seznam infekčních agens, která jsou přenosná transfuzí krve a jejích složek. V tabulce číslo 4²¹ jsou uvedeny pouze ty nejčastější patogeny, u kterých byl přenos transfuzí prokázán.

²¹ Pozn. k tabulce č. 4 : Ad Bakterie – endogenní kontaminace nastává tehdy, pokud je bakterie přítomná v cirkulaci dárce krve v době odběru. Exogenní kontaminace nastává tehdy, pokud se bakterie dostane do odběrové soupravy v průběhu odběru, v průběhu zpracování krve a/nebo v době skladování a transportu transfuzních přípravků.

Tabulka 4: Přehled infekčních agens, u kterých byl prokázán přenos transfuzí²²

Viry	Viry hepatitid	Hepatitis A virus
		Hepatitis B virus
		Hepatitis C virus
		Hepatitis D virus
		Hepatitis E virus
		Hepatitis G virus
	Retroviry	HIV 1 a 2
		HTLV I a II
	Herpes viry	CMV
		EBV
		HHV-6 a HHV-8
	Parvoviry	Parvovirus B19
	Flaviviry	West Nile Virus
Bakterie	Endogenní kontaminace	Treponema pallidum
		Borrelia burgdorferi
		Brucella melitensis
		Yersinia enterocolitica
		Salmonella
		Campylobacter
		Streptococcus
		Staphylococcus
	Exogenní kontaminace	Pseudomonas
		Serratia
		Staphylococcus
	Rickettsie	
Protozoa		Plasmodia
		Trypanosoma cruzi
		Toxoplazma gondii
		Babesia microti/ divergens
		Leishmanie

²² Zdroj: MURPHY, M. F., PAMPHILON, D. H. *Practical Transfusion Medicine*. Blackwell Science, 2001,-tab.19.1)

5.2.1 Viry hepatitid

Virové hepatitidy jsou difúzní zánětlivě nekrotická onemocnění jater. Akutní i chronické formy onemocnění jsou příčinou významné morbidity a mortality u nás i ve světě. Akutní virové hepatitidy jsou nejčastějšími jaterními onemocněními v celosvětovém měřítku a vedou k 1-2 milionům úmrtí ročně. U některých typů je možný i chronický průběh, který se projevuje jako chronická hepatitida, jaterní cirhóza nebo hepatocelulární karcinom. Klinické známky hepatitidy mohou být způsobeny různými viry (EBV²³, CMV, virem rubelly, enteroviry a dalšími), ale nejdůležitějšími původci virových hepatitid jsou: virus hepatitidy A (HAV²⁴), virus hepatitidy B (HBV), virus hepatitidy C (HCV), virus hepatitidy D (HDV²⁵), virus hepatitidy E (HEV²⁶) a virus hepatitidy G (HGV²⁷).⁽¹⁷⁾

Uvedené viry nemají žádné společné antigeny a nereagují zkříženě v imunologických testech, jsou morfologicky i biologicky odlišné, ale mají některé společné vlastnosti:

- a) člověk je jejich výhradním hostitelem v přírodě,
- b) infekce není přenosná na běžná laboratorní zvířata (výjimkou jsou někteří primáti),
- c) kultivace in vitro v buněčných kulturách není možná nebo je velmi obtížná,
- d) klinické projevy infekce uvedenými viry se nedají vzájemně rozeznat.^(18,19)

5.2.1.1 Virus hepatitidy A

Virus hepatitidy A (HAV) je malý neobalený RNA virus, patří do čeledi Picornaviridae. K přenosu infekce dochází fekálně-orální cestou, protože HAV se vylučuje stolicí. K přenosu infekce krví a sexuálně dochází jen vzácně, k vertikálnímu přenosu nedochází.

²³ Epstein-Barrové virus

²⁴ Virus hepatitidy A

²⁵ Virus hepatitidy D

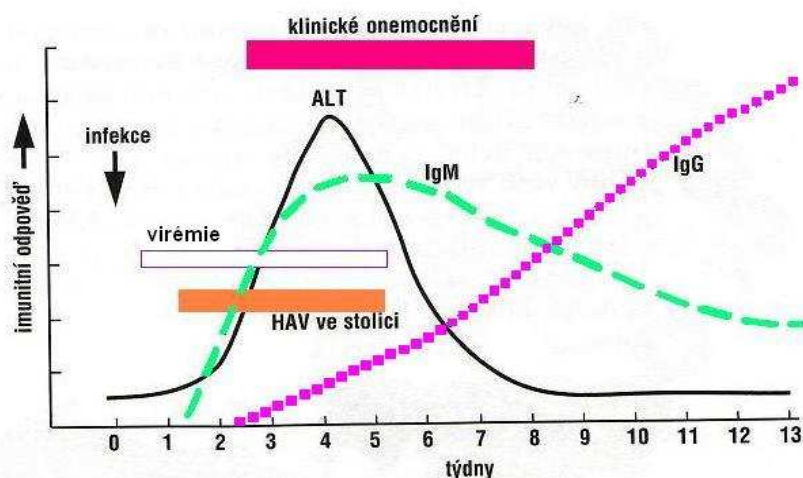
²⁶ Virus hepatitidy E

²⁷ Virus hepatitidy G

U hepatitidy A trvá inkubační doba 15 až 45 dnů, v této době je virus prokazatelný ve stolici a dva týdny před nástupem klinických příznaků je HAV prokazatelný i v krvi. Vylučování viru stolicí je maximální ke konci inkubace a trvá ještě po krátkou dobu po nejvýraznějších projevech klinických příznaků. ^(17,18,19)

Specifické protilátky proti HAV se dají zjistit přibližně od 4. týdne po infekci, maximálních hodnot dosahují v době mezi 12. a 20. týdnem.

Obrázek 1: Sérologické nálezy v průběhu onemocnění hepatitidou A²⁸



U dětí probíhá infekce HAV často inaparentně, pokud je onemocnění klinicky zjevné, projevuje se ke konci inkubační doby únavou, zvýšenou teplotou nebo dokonce i horečkou, nechutenstvím, nauzeou a zvracením. Dochází ke zvětšení jater, je patrný ikterus různého stupně. V séru zjišťujeme zvýšené hodnoty transamináz. ^(17,18,19)

Onemocnění hepatitidou A trvá 3 týdny až měsíc a obvykle končí uzdravením. Hepatitida A neprechází do chronicity a také fulminantní průběh vedoucí k smrti jedince je u infekce HAV zcela výjimečný. ^(17,18,19)

Sérologická diagnostika hepatitidy A je snadná. Přítomnost protilátek anti-HAV IgM znamená akutní infekci, po překonané infekci doživotně přetrvávají protilátky anti-HAV IgG. Známkou imunity je u jedince přítomnost protilátek anti-HAV IgG. ⁽¹⁷⁾

²⁸ Zdroj : HUSA, P. *Virové hepatitidy*. Galén, 2005, strana 26, obr. 1.4.

Z pohledu transfuzní medicíny má význam skutečnost, že ačkoli se potransfuzní hepatitida A vyskytuje velmi zřídka, může se vyskytnout tehdy, když si dárce krve není vědom rizikové expozice a navíc přichází darovat krev v období prvních několika dní virémie ještě před rozvinutím se klinických projevů onemocnění. Serologický test k rutinnímu testování dárců krve ke zjištění infekce HAV nemají zařízení transfuzní služby k dispozici, protože v době virémie nejsou ještě přítomny protilátky.

Pokud je u pacienta podezření na potransfuzní hepatitidu, je třeba vzít v úvahu i možnost potransfuzní hepatitidy A, i přes to, že je pravděpodobnost výskytu potransfuzní hepatitidy A velmi malá.

5.2.1.2 Virus hepatitidy B

Virus hepatitidy B (HBV) je malý obalený DNA virus, patří do čeledi Hepadnaviridae. K přenosu infekce dochází krví, sexuálně i vertikálně. K enterálnímu přenosu infekce virem hepatitidy B nedochází. HBV patří k virům, které mají společnou typickou morfologii, způsob replikace a další charakteristické vlastnosti jako je např. velmi úzký okruh hostitelů, výrazný tropismus k jaterním buňkám a tendence perzistovat v organismu a navozovat vznik chronické hepatitidy, nemoci z imunokomplexů, jaterní cirhózy a hepatocelulárního karcinomu.⁽¹⁷⁾

Ve struktuře HBV se rozlišuje HBcAg a HBeAg a povrchový antigen HBsAg. HBsAg je antigenně komplexní částice, na základě čehož vznikají různé antigenní determinanty. Společnou determinantou je „a“, ostatní determinanty se označují „d“, „y“, „w“, „r“. HBV se klasifikuje do čtyř subtypů: adr, adw, ayr, ayw. Tato klasifikace má praktický epidemiologický význam, protože zastoupení těchto subtypů se geograficky liší. Na základě analýzy nukleotidových sekvencí genomu viru hepatitidy B je postavena i klasifikace genotypová. V současnosti je známo 8 genotypů HBV. Tyto genotypy se označují velkými písmeny A, B, C, D, E, F, G, H. Genotypy HBV vykazují více než 8% variabilitu a to v sekvencích nukleotidů kompletního genomu. V Evropě se nejčastěji vyskytují genotypy A a D.⁽¹⁷⁾

DNA virus hepatitidy B využívá pro svou replikaci RNA²⁹ a reverzní transkriptázu a tím je umožněn vznik mutací viru. Vzniklé mutace nemusejí mít buď žádné následky nebo mohou poškozovat virovou replikaci anebo mohou měnit vnímavost hostitele k virové infekci. Je zřejmé, že vliv mutací je velmi variabilní. Nejčastější mutace HBV je záměna guaninu za adenin v pre-core oblasti virového genomu a je významná tím, že způsobuje vznik stop-kodonu, který zabraňuje translaci HBeAg. Důsledkem této mutace je skutečnost, že pacienti s akutní i chronickou hepatitidou vyvolanou touto mutantou mají negativní HBeAg, pozitivní HBsAg, HBV DNA a protilátky anti-HBe. Proto diagnostika HBeAg v séru jako ukazatele akutní infekce ztrácí v současné době na významu.⁽¹⁷⁾

Infekce hepatitidou B probíhá jako akutní nebo jako chronické onemocnění. Akutní hepatitida B je většinou benigní onemocnění, které obvykle končí spontánním uzdravením. Fulminantní průběh s vysokou mortalitou se vyskytuje v 0,1-1% případů. Pokud trvá infekce HBV déle než 6 měsíců, je označována jako chronická. Nejvyšší pravděpodobnost přechodu do chronicity je u infekcí novorozenců, u dospělých osob přechází infekce HBV do chronicity u 1-5% jedinců, u imunosuprimovaných dospělých nemocných je však tato pravděpodobnost daleko vyšší.⁽¹⁷⁾

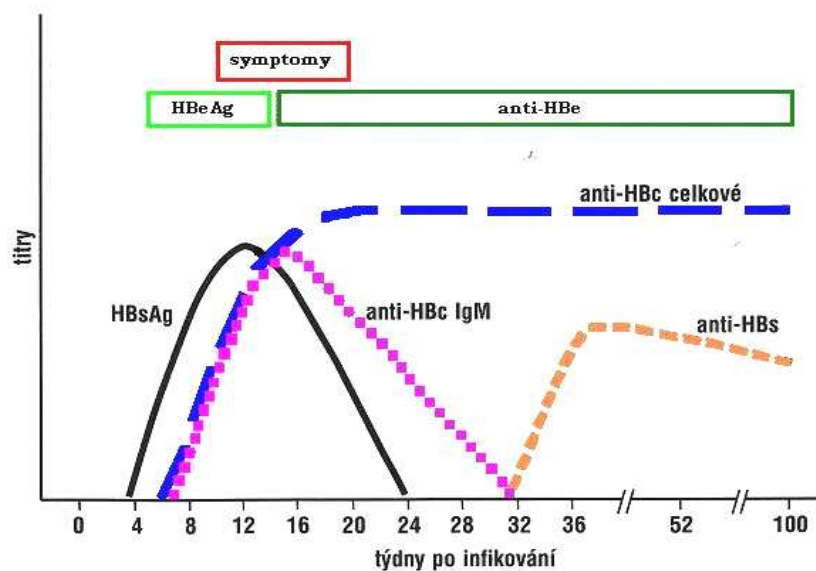
Pacienty s chronickou hepatitidou B lze rozdělit na základě výsledků laboratorních testů do dvou základních skupin:

- a) HBsAg pozitivní pacienti s perzistující aktivní virovou replikací,
- b) HBsAg pozitivní pacienti s útlumem virové replikace. K tomuto útlumu (dočasnému nebo trvalému) dochází buď v důsledku koinfekce s virem hepatitidy D popř. virem hepatitidy C nebo se jedná o inaktivní nosičství HBsAg anebo dochází ke střídání fází aktivní replikace a klidu (což je typický nález infekce HBeAg-minus mutantním virem), a konečně se může jednat o okultní infekci virem hepatitidy B, kdy nelze prokázat HBsAg v séru.⁽¹⁷⁾

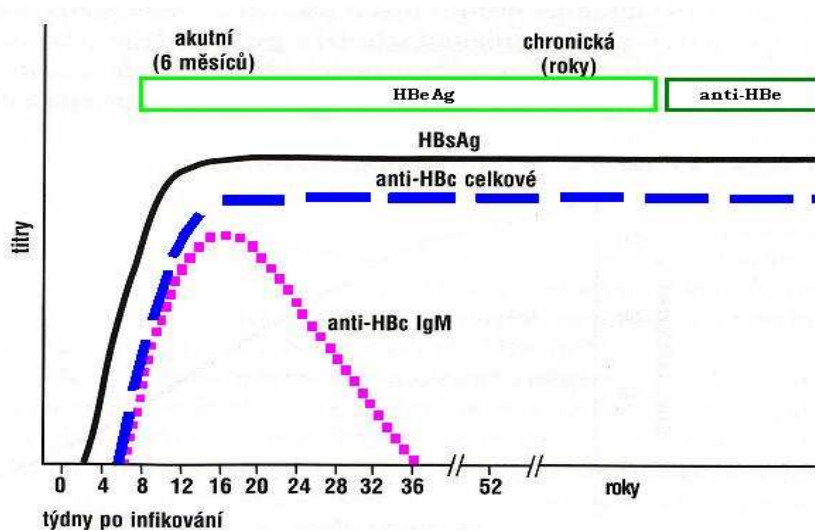
Sérologická diagnostika infekce HBV je poměrně komplikovaná, protože se sleduje celá řada markerů. (viz obrázky č.2 a č.3)

²⁹ Ribonucleic Acid

Obrázek 2: Sérologické nálezy v průběhu onemocnění akutní hepatitidou B (bez přechodu do chronicity)³⁰



Obrázek 3: Sérologické nálezy v průběhu progresu akutní hepatitidy B do chronicity³¹



³⁰ Zdroj: HUSA, P. *Virové hepatitidy*. Galén, 2005, str. 34, obr. 1.9.

³¹ Zdroj: HUSA, P. *Virové hepatitidy*. Galén, 2005, str.38, obr. 1.11.

V tabulce č.5 je uveden přehled sérologických a molekulárně-genetických nálezů u infekce HBV a jejich význam.

Tabulka 5: Sérologické a molekulárně-genetické nálezy u infekce HBV a jejich význam³²

	HBsAg	anti-HBs	HBeAg	anti-HBe	IgG anti-HBc	IgM anti-HBc	HBV DNA
Akutní VHB	+	-	+	-	+	+	+
Chronická VHB-aktivní replikace	+	-	+	-	+	+/-	+
Chronická VHB-inaktivní nosičství	+	-	-	+	+	-	-
Prodělaná infekce	-	+	-	+	+	-	-
Účinná vakcinace	-	+	-	-	-	-	-

V minulosti byla hepatitida B závažnou komplikací transfuze krve a jejích složek. Situace se změnila po zavedení vyšetřování HBsAg do rutinního screeningového testování dárců krve. HBsAg se jako první objevuje v krvi, kde dlouhodobě přetrvává a objevuje se i u některých chronických infekcí HBV. Další markery infekce HBV slouží spíše jako konfirmační vyšetření infekce HBV a k určení stadia infekce, ale kromě zjištění protilátek anti-HBc nemají význam pro rutinní vyšetřování dárců krve.

5.2.1.3 Virus hepatitidy C

Virus hepatitidy C (HCV) je malý obalený RNA virus patřící do čeledi Flaviviridae. K přenosu infekce dochází krví, vzácně je možný i sexuální a vertikální přenos, k enterálnímu přenosu nedochází. HCV charakterizuje mimořádná genetická variabilita, která je nejspíše způsobena velkou frekvencí mutací při velmi rychlém obratu viru v organismu při dlouhotrvající infekci. Simmondsova klasifikace rozlišuje šest hlavních genotypů viru, které se označují číslicemi 1 až 6, Simmondsova klasifikace dále rozlišuje více než 50 subtypů HCV, které se označují malými písmeny abecedy.

³² Zdroj: HUSA, P., *Virové hepatitidy*. Galén, 2005, str.36, tab.č.1.3.

Pokud je tedy jedinec infikován HCV, je infikován směsí různých virů. Tyto kvazidruhy (quasispecies) se navzájem odlišují svými genomy. V České republice převládá infekce HCV typem 1.⁽¹⁷⁾

Klinicky se hepatitida C projevuje jako akutní nebo chronická. Akutní hepatitida C probíhá většinou mírně nebo dokonce asymptomaticky, což je důvodem, proč ve většině případů nebývá zjištěna. Dalším důvodem je skutečnost, že akutní hepatitida C probíhá většinou v anikterické formě. Závažný a fulminantní průběh akutní hepatitidy C je extrémně vzácný, ale vyskytuje se při výrazném abúzu alkoholu nebo při koinfekci s HBV nebo HIV. Pravděpodobnost, že akutní hepatitida C přejde do chronické formy, závisí například na věku, způsobu přenosu infekce a velikosti infekční dávky. Vyšší pravděpodobnost přechodu do chronicity je u starších lidí, při větší infekční dávce přenesené například transfuzí krve, dále se riziko přechodu akutní hepatitidy C do chronické formy zvyšuje při současné infekci HBV a v neposlední řadě zvyšuje riziko vzniku chronické hepatitidy C abúzus alkoholu nebo imunosuprese. U většiny infikovaných osob progreduje onemocnění jako chronická aktivní hepatitida C, ze které se vyvine jaterní cirhóza nebo hepatocelulární karcinom.⁽¹⁷⁾

První volbou diagnostiky hepatitidy C je průkaz protilátek anti-HCV serologickými metodami. Nepřímý průkaz infekce HCV je možný i pomocí testu RIBA³³, dále je možné provádět testování HCV RNA, např. u imunosuprimovaných pacientů je možný průkaz HCV RNA za současné negativity anti-HCV protilátek, které se buď ještě nevytvořily nebo je díky imunosupresi jejich tvorba utlumena.⁽¹⁷⁾

Z výše uvedeného je zřejmé, že vzhledem k častému asymptomatickému průběhu hepatitidy C v počátcích onemocnění, bylo zavedení testování protilátek anti-HCV u dárců krve pro snížení rizika přenosu infekce HCV enormně významné. I v současné době však představuje diagnostické okno při vyšetření protilátek anti-HCV serologickými metodami poměrně značné riziko přenosu infekce transfuzí.

³³Rekombinantní imunoblot

5.2.1.4 Virus hepatitidy D

Virus hepatitidy D (HDV) je RNA satelitní virus (virus HDV není schopen přenosu a množení bez HBV), patří do čeledi Deltaviridae. Přenos infekce je možný krví, sexuálně i vertikálně. Enterálně se infekce virem HDV nepřenáší.

Obal HDV tvoří HBsAg, v jádru je antigen HDV. V současné době jsou známy tři genotypy HDV (I, II, III). V České republice se infekce HDV vyskytuje jen výjimečně.⁽¹⁷⁾

Z pohledu transfuzní medicíny má význam skutečnost, že HDV není schopen přenosu a množení bez HBV, proto není nutné zavádět testování HDV u dárců krve.

5.2.1.5 Virus hepatitidy E

Virus hepatitidy E (HEV) je neobalený RNA virus. Přenos infekce je možný enterálně a vertikálně, vzácně sexuálně, krví se infekce nepřenáší. Klinický průběh je těžší než u hepatitidy A, ale do chronicity hepatitida E nepřechází. Diagnóza hepatitidy E se obvykle stanoví na základě přítomnosti protilátek anti-HEV.⁽¹⁷⁾ Ale vzhledem k tomu, že v rámci přenosu se chová HEV v podstatě jako virus hepatitidy A, není nutné zavádět testování HEV u dárců krve.

5.2.1.6 Virus hepatitidy G

Virus hepatitidy G (HGV) je RNA virus, patří mezi Flaviviridae. K přenosu infekce dochází krví, ale je možný i sexuální a vertikální přenos. K enterálnímu přenosu infekce nedochází. Častá je i duální infekce HGV s HCV nebo s HBV.

Infekci HGV lze diagnostikovat průkazem HGV RNA nebo za předpokladu vymizení HGV RNA ze séra lze prokázat protilátky proti obalovému proteinu HGV (anti-HGV E2). Tyto protilátky jsou důkazem překonané infekce HGV.⁽¹⁷⁾

V současné době se neplánuje zavedení rutinního testování HGV u dárců krve. Důvodem není pouze skutečnost, že není k dispozici test, který by vyhovoval potřebám zařízení transfuzní služby, ale také to, že stále ještě není zcela jasná úloha HGV při přenosu onemocnění.

Kromě toho byla zjištěna přítomnost HGV pouze u některých pacientů s potransfuzní hepatitidou, kteří měli negativní výsledky při testování na „ostatní hepatitidy“. Nicméně je jasné, že HGV transfuzí přenosný je.

5.2.2 Retroviry

Do čeledi Retroviridae patří RNA viry s charakteristickým způsobem replikace. Genom RNA (+) je přepisován do DNA³⁴ (-) s následující syntézou komplementárního DNA (+) vlákna. Transkript v podobě dvouvláknové DNA migruje do jádra, kde je integrován do buněčné DNA jako tzv. provirus. Virové iRNA jsou přepisovány pouze z proviru.

Pro retroviry je typické, že mají některé vlastnosti RNA virů (vysokou rychlost replikace a značnou proměnlivost) a současně i DNA virů (schopnost integrace do buněčného genomu, vznik dlouhodobě latentních infekcí, značný onkogenní potenciál).^(18,19)

Transfuzní medicína věnuje pozornost zejména retrovirům, původcům onemocnění AIDS (HIV 1 a 2) a lidským T-lymfotropním virům 1 a 2.

5.2.2.1 Lidský virus imunitní nedostatečnosti

Onemocnění způsobené lidským virem imunitní nedostatečnosti si poprvé vyžádalo zájem odborné i laické veřejnosti v roce 1981, a to jako devastující fatální onemocnění neznámé etiologie doprovázené výrazným poklesem CD4+ buněk. Onemocnění se vyskytovalo v USA u sexuálně aktivních homosexuálních mužů, injekčních uživatelů drog, imigrantů z Haity a u hemofiliků, kteří byli léčeni koncentráty koagulačních faktorů. Z epidemiologických údajů vyplynulo, že jde o nové infekční onemocnění, které je přenosné sexuální cestou a krví. Epidemiologické i virologické důkazy o tom, že onemocnění AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) způsobuje virus, byly podány v letech 1983-1984.

³⁴ Deoxyribonucleic Acid

Na výzkumu se podílely výzkumné týmy Montagniera v Paříži, Galla v Bethesdě a Levyho v San Francisku. Virus byl v roce 1986 nazván HIV (human immunodeficiency virus). V roce 1986 byl identifikován u jedinců ze západní Afriky příbuzný virus HIV-2, u kterého jsou cesty přenosu stejné, častější je ale heterosexuální přenos a progresse infekce do rozvinutého stadia (AIDS) je pomalejší.⁽¹⁸⁾

Existují tedy 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, ale homologie genomu obou těchto virů je téměř 50%. Většinu onemocnění vyvolává HIV-1. Na základě genetických rozdílů se HIV-1 dělí do tří skupin: M (major- hlavní typ), O (outliers- vedlejší typ) a N (non-M-non-O). Skupina M je zodpovědná za světovou epidemii. Kmeny v ní zahrnuté se rozdělují do 9 odlišných subtypů A-K a mezi subtypy vznikají četné rekombinantní formy, které se nazývají CRF³⁵ a URF³⁶. Skupiny O a N nemají subtypy. HIV-2 má dosud 6 subtypů.

V České republice byly v důsledku migrace obyvatelstva nalezeny různé subtypy, ale nejběžnějším subtypem u nás je subtyp B, který dominuje jak v Evropě, tak i v Severní a Jižní Americe.⁽¹⁸⁾

Epidemiologická situace je velice vážná, pandemie trvale pokračuje. Denně se HIV nakazí asi 14000 lidí, z nichž více než 15% jsou děti do 10 let. Celosvětově přibývá HIV-pozitivních žen ve fertilním věku, čímž se vysvětlují stále stoupající počty dětí infikovaných HIV ve světě. Nejvyšší výskyt osob infikovaných HIV je v subsaharské Africe, v jihovýchodní Asii a v zemích bývalého Sovětského svazu.^(18,19) V České republice byl od roku 2007 do roku 2010 zaznamenán nárůst nově zachycených případů HIV pozitivních osob. Počty nově zachycených se pohybují nad 100 nových případů ročně. V roce 2011 již bylo v České republice celkem 1675 HIV pozitivních osob. Nejvíce HIV pozitivních připadá na Prahu (k 31.12.2011 to bylo 800 evidovaných HIV pozitivních osob), dále na Středočeský a Jihomoravský kraj.⁽⁶²⁾

Testování dárců krve na známky infekce HIV se provádí na celém světě. Diagnostika infekce HIV se v zařízeních transfuzní služby běžně provádí průkazem protilátek anti-HIV 1 a 2 a zjištěním p24 antigenu HIV.

³⁵ Circulating Recombinant Forms

³⁶ Unique Recombinant Forms

5.2.2.2 Lidský T-lymfotropní virus

Rozlišujeme lidský T-lymfotropní virus-1 (HTLV-1) a lidský T-lymfotropní virus -2 (HTLV-2). HTLV-1 se vyskytuje především v Japonsku, v centrální Africe, v Karibské oblasti a u australských domorodců.

V Evropě je prevalence pod 0,5%. Infekce se šíří především krví, možný je i vertikální přenos, přenos sexuální cestou je méně významný.⁽¹⁸⁾ Nákaza proběhne u člověka většinou asymptomaticky a projeví se pouze sérokonverzí. Virus však perzistuje v lidském organismu a může způsobit poruchu regulace imunity. Diagnostika je založena na průkazu specifických protilátek.⁽¹⁸⁾

HTLV-2 se vyskytuje nejvíce u severoamerických a jihoamerických Indiánů a u intravenózních uživatelů drog. Prevalence HTLV-2 je podstatně nižší než u HTLV-1. Infekce probíhá obvykle subklinicky.⁽¹⁸⁾

V České republice se testování HTLV-1 a HTLV-2 u dárců krve neprovádí.

5.2.3 Herpes viry

Všechny herpetické viry mají schopnost vyvolávat dlouho trvající latentní infekci a reaktivovat se při oslabení imunity.

Replikace herpetických virů probíhá uvnitř buněčného jádra, lipidový obal virů má původ v jaderné membráně. Po skončení replikace infikované buňky zanikají.^(18,19)

5.2.3.1 Cytomegalovirus

Cytomegalovirus (CMV) je největší virus, který infikuje člověka. Patří mezi nejběžnější oportunní patogeny. Zdrojem infekce je nemocný člověk nebo nosič, který vylučuje virus slinami nebo močí. K přenosu infekce dochází horizontálně (vzdušnou cestou, kontaktem, sexuálně, mateřským mlékem, krví), ale i vertikálně.^(18,19)

Virus je rozšířený po celém světě, ve všech populacích. Promořenost stoupá s věkem, u dospělých je až 60%, v některých oblastech Afriky až 100%.

Primoinfekce je obvykle asymptomatická, ale právě v důsledku asymptomatické primoinfekce dojde k rozšíření viru do různých tkání a orgánů. CMV poté celoživotně perzistuje v latentním stavu v T-lymfocytech (i jiných leukocytech), v tkáních a orgánech.

U imunosuprimovaných jedinců může dojít k reaktivaci latentní infekce s těžkým průběhem. Klinicky rozlišujeme cytomegalovou infekci vrozenou nebo získanou. Pokud je nákaza získaná, primoinfekce probíhá, jak již bylo zmíněno, u imunokompetentních osob obvykle asymptomaticky nebo se projevuje „chřipkovými příznaky“. Infekce cytomegalovirem se může projevovat i těžšími klinickými stavy jako je syndrom infekční mononukleózy nebo cytomegalová hepatitida.⁽¹⁸⁾

Pokud dojde k přenosu CMV transfuzí krve nebo jejích složek imunokompetentnímu pacientovi, může být potransfuzní cytomegalová infekce klinicky zcela asymptomatická, zjištělná pouze na základě vytvoření protilátek proti-CMV. Naproti tomu u imunosuprimovaného pacienta může mít potransfuzní cytomegalová infekce vážný, dokonce i fatální průběh.⁽¹⁴⁾

V České republice není testování CMV součástí screeningu infekčních markerů u dárců krve.

5.2.3.2 Virus Epstein a Barrové

Virus Epstein a Barrové (EBV) je rozšířen po celém světě. Zdrojem nákazy jsou nemocní lidé, osoby s inaparentní infekcí a zdraví nosiči viru, u nichž dochází k reaktivaci viru a vylučování viru slinami. K přenosu infekce obvykle dochází přímým kontaktem (sliny) nebo kapénkovou cestou.

U malých dětí probíhá nákaza obvykle inaparentně, v dorostovém věku (mezi 15. a 20. rokem) vznikne manifestní onemocnění (infekční mononukleóza). V dospělosti lze prokázat protilátky proti EBV až u 90% evropské populace.

Onemocnění zanechává dlouhodobou imunitu, ale vzhledem k tomu, že virus po naze doživotně perzistuje v organismu, může se při různých podnětech reaktivovat. EBV má také určitý onkogenní potenciál – infekce EBV je spjata se vznikem různých maligních onemocnění, jako je např. Burkittův lymfom, primární lymfom mozku, Hodgkinův lymfom a nazofaryngeální karcinom.

S EBV infekcí jsou spjata i další relativně benigní onemocnění jako je např. potransfuzní lymfoproliferativní onemocnění a lymfoproliferativní onemocnění vázané na X chromozom. O EBV se také diskutuje jako o možném původci chronického únavového syndromu.⁽¹⁸⁾

Diagnózu infekce virem Ebsteina a Barrové podporuje přítomnost heterofilních protilátek v séru (Paulova-Bunellova reakce). Při nejasných nálezech se provádí vyšetření protilátek proti jednotlivým antigenům EBV.⁽¹⁸⁾

Přenos EBV transfuzí je možný, EBV je také jednou z příčin tzv. „postperfuzního syndromu“ – stavu podobnému viróze, který se objevuje po transfuzi čerstvé krve v kardiovaskulární chirurgii. EBV přenesený transfuzí není velkým klinickým problémem, ačkoli může dojít i k přenosu na příjemce orgánů.⁽¹⁴⁾

V České republice není testování EBV součástí screeningu infekčních markerů u dárců krve.

5.2.3.3 Lidský herpetický virus 6 a lidský herpetický virus 8

Lidský herpetický virus 6 (HHV-6³⁷) je všeobecně rozšířený T-lymfotropní herpetický virus. Primární infekce jsou nejčastější v dětském věku, kdy je infikováno 60-90% lidské populace. Infekce se šíří nejčastěji přímým kontaktem, vysoce pravděpodobný je i vertikální přenos.

U dospělých imunokompetentních jedinců probíhá primoinfekce či reaktivace HHV-6 pod obrazem infekční mononukleózy, vzácně může infekce HHV-6 způsobit fulminantní hepatitidu.⁽¹⁸⁾

Diagnózu infekce HHV-6 lze stanovit izolací viru nebo průkazem specifických protilátek.⁽¹⁸⁾

Lidský herpetický virus 8 (HHV-8³⁸) má schopnost přebírat hostitelské geny do vlastního genomu. K přenosu infekce dochází sexuálně a krví, ale je možný i přenos slinami. Promořenost populace je tedy úměrná promiskuitě.⁽¹⁸⁾

³⁷ Lidský herpetický virus 6

³⁸ Lidský herpetický virus 8

HHV-8 způsobuje latentní infekci, má ale i onkogenní potenciál (přisvojené buněčné geny ve virové DNA). U osob se závažnou poruchou buněčné imunity je vysoká pravděpodobnost, že se v průběhu několika let vyvine Kaposiho sarkom nebo jiné maligní onemocnění.⁽¹⁸⁾

Infekci HHV-8 lze prokázat sérologicky vyšetřením protilátek proti jadernému antigenu nebo zjistit virovou DNA v biologickém materiálu.⁽¹⁸⁾

V současné době není sice známo, zda je možné přenést infekci HHV-8 krví, ale všeobecně nejsou infekce HHV-6 a HHV-8 považovány za krví přenosné.⁽¹⁴⁾

5.2.4 Parvoviry

Parvoviry jsou malé neobalené viry, značně rozšířené. Pro člověka je patogenní pouze parvovirus B-19.⁽¹⁸⁾

5.2.4.1 Parvovirus B-19

Parvovirus B-19 má schopnost množit se v kmenových buňkách erytrocytární krevní řady. Virus se vyskytuje na celém světě. Zdrojem nákazy je člověk s inaparentní nebo manifestní infekcí. K přenosu infekce dochází vzdušnou cestou, krví a vertikálně.⁽¹⁸⁾

Infekci parvovirem B-19 potvrdí průkaz specifických protilátek nebo izolace viru.⁽¹⁸⁾

Z pohledu transfuzní medicíny je významné, že infekci parvovirem B-19 lze přenést nejen transfuzí krve a jejích složek, ale i krevními deriváty, např. koncentráty koagulačních faktorů.

V České republice není testování parvoviru B-19 součástí screeningu infekčních markerů u dárců krve.

5.2.5 Flaviviry

Čeď Flaviviry patří mezi arboviry. Tyto viry patří do různých, navzájem nesouvisejících rodů, ale přesto mají nemoci vyvolané těmito viry mnoho společných rysů. Přenašeči arbovirových infekcí jsou různí členovci, kteří napadají obratlovce a sají z nich krev (např. komáři, pakomáři, muchničky, klíšťata).

A protože je výskyt členovců vázán na určité biotopy, infekce jimi přenášené vykazují přírodní ohniskovost.

Arbovirové infekce patří většinou mezi zoonózy, člověk je pouze náhodným hostitelem. Člověk je dominantním hostitelem pouze u městské formy dengue a u žluté zimnice. Mnohé arbovirové infekce probíhají inaparentně, u některých se objeví krátkodobá virémie, klinicky se projevující horečnatým onemocněním podobným chřipce se spontánní úpravou po několika dnech.⁽¹⁸⁾

5.2.5.1 Virus západonilské horečky

Virus západonilské horečky (WNV³⁹ – West Nile Virus) je RNA virus, patřící k arbovirům, řadí se do čeledi Flaviviridae. Rezervoárem infekce jsou ptáci, k přenosu dochází při bodnutí komáry.

Virus se vyskytuje v Africe, Asii, jižní a východní Evropě a v Austrálii, Americe. Infekce má obvykle inaparentní průběh, v případě klinické manifestace začíná onemocnění náhle horečkou a silnou bolestí hlavy, prognóza je obvykle příznivá, ale v některých případech dochází ke komplikacím, zejména neurologickým.⁽¹⁸⁾

Diagnóza se stanovuje průkazem specifických protilátek v krvi nebo průkazem viru v krvi.⁽¹⁸⁾ Z pohledu transfuzní medicíny má význam biologické chování viru, na základě kterého se předpokládá, že je infekce WNV přenosná transfuzí krve. Dokazuje to i skutečnost, že infekce byla zjištěna u pacientů po orgánových transplantacích a u pacientů, kterým byla podána transfuze krve.⁽¹⁴⁾

³⁹ West Nile Virus

V České republice není zařazeno testování dárců krve na známky infekce WNV. Testování známek infekce WNV je zařazeno do screeningu infekčních markerů u dárců krve v USA, kde se provádí v letních měsících u dárců krve přicházejících z endemických oblastí.

5.2.6 Původci endogenní bakteriální kontaminace

Endogenní bakteriální kontaminace nastává tehdy, pokud je bakterie přítomná v cirkulaci dárce krve v době odběru. V následující kapitole je uveden přehled bakterií, které jsou nejčastější příčinou endogenních bakteriálních kontaminací.

5.2.6.1 *Treponema pallidum*

Treponema pallidum je fakultativně anaerobní spirocheta, pro člověka primárně patogenní, která je původcem syfilis. K přenosu infekce dochází sexuálně, vertikálně, těsným kontaktem se slizničními a kožními lézemi, při poranění kontaminovanou jehlou, ale přenos infekce je možný i transfuzí krve. Infikovaní jedinci jsou maximálně infekční v časném stadiu, tedy ve stádiu tvrdého vředu, kondylomat a mukózních lézí.^(21,24)

Přímá diagnostika syfilis je možná pouze mikroskopicky. Laboratorní diagnostika syfilis je založena na průkazu specifických antitreponemových protilátek.^(21,24)

Z pohledu transfuzní medicíny je syfilis významné onemocnění, protože *Treponema pallidum* ve skladované krvi (koncentrátech erytrocytů, plné krvi) přežívá při 4°C po dobu od 4 do 21 dnů (údaje o době přežití *Treponemy pallidum* ve skladované krvi jsou různé u různých autorů, ale naprostá shoda je v tom, že *Treponema pallidum* přežívá ve skladované krvi v chladu při teplotě 4°C po několik dnů).

Testování známek infekce syfilis je v České republice zařazeno do screeningu infekčních markerů u dárců krve.

5.2.6.2 *Borrelia burgdorferi*

Borrelie jsou aktivně pohyblivé spirálovité bakterie, které jsou parazity zvířat i člověka. Pro jejich epidemiologii je důležitý přenos členovci. Lymská nemoc, jejímž původcem je *Borrelia burgdorferi*, je přenosná především klíšťaty, ale i mouchami, komáry a dalším hematofágním hmyzem.

Onemocnění se vyskytuje sezónně, do klinického obrazu patří charakteristický kožní erytém s centrálním výbledem, horečka a lymfadenopatie.^(21,24)

Diagnostika onemocnění je založena na průkazu specifických antiborreliových protilátek. Z pohledu transfuzní medicíny je významná skutečnost, že *Borrelia burgdorferi* přežívá ve skladované krvi po dobu až 6 týdnů. Protože průběh Lymské nemoci je symptomatický, je při pečlivém výběru dárců riziko přenosu Lymské nemoci transfuzí minimální.^(21,24)

Testování známek infekce *Borrelia burgdorferi* (Lymské nemoci) není v České republice zařazeno do screeningu infekčních markerů u dárců krve.

5.2.6.3 *Brucella melitensis*

Brucella je typický zvířecí a lidský parazit, který způsobuje brucelózu, což je antropozoonóza, která primárně postihuje hospodářská zvířata, ze kterých je přenosná na člověka. Brucelóza není obvykle přenosná z člověka na člověka, ale vzhledem k období bakteriémie je možný i přenos transfuzí krve, zejména v endemických regionech. Diagnostika onemocnění je možná kultivačně nebo metodami imunologickými nebo serologickými.^(21,22)

Vzhledem k tomu, že přenos brucelózy transfuzí krve je možný, je nutné důsledně z registru dárců krve vyřazovat jedince, kteří jsou riziková z hlediska infekce brucelózou (expozice infekci nebo infekce brucelózou v anamnéze).

Testování známek infekce způsobené *Brucella melitensis* není v České republice zařazeno do screeningu infekčních markerů u dárců krve.

5.2.6.4 *Yersinia enterocolitica*

Yersinia enterocolitica je velmi rozšířená jako zvířecí parazit. Vyskytuje se v primárně infikovaném mase, může kontaminovat i vodu. Infekce yersinií jsou alimentární. K infekci nejčastěji dochází požitím masa infikovaných vepřů. Klinický obraz se mění podle věku. U dětí se infekce projevuje horečkou a průjmy, u dospělých jedinců převažují příznaky infekce zažívacího traktu a průjmy.^(21,23)

Diagnostika onemocnění se provádí biochemickými a serologickými metodami.^(21,23)

Z pohledu transfuzní medicíny je yersiniová infekce významná z několika důvodů:

- a) období bakteriémie je asymptomatické
- b) *Yersinia enterocolitica* je schopna volně přežívat a množit se v krvi, v transfuzních přípravcích a to i po dobu skladování transfuzních přípravků při nízkých teplotách.⁽¹⁵⁾

Z těchto důvodů je třeba věnovat pozornost těm údajům v anamnéze potenciálních dárců krve, které by mohly být rizikem z hlediska přenosu yersiniové infekce. Testy vhodné k vyšetřování dárců krve nejsou k dispozici, takže se potransfuzní sepsé způsobené yersinií *enterocolitica* řadí i v současné době k vážným potransfuzním komplikacím.

5.2.6.5 *Salmonella*

Salmonely jsou fakultativně anaerobní gramnegativní tyčky, patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*. Obvykle žijí jako komensálové a příležitostní parazité ve střevním traktu různých obratlovců. Řadí se mezi fakultativně intracelulární parazity, ale v prostředí bohatém na proteiny mohou žít i jako saprofyty.

Odolávají vyschnutí i teplotám pod bodem mrazu, jsou schopny množení při teplotách kolem 5°C, což je teplota skladování transfuzních přípravků, které obsahují erythrocyty. Podle moderní klasifikace, která vychází z genetické analýzy, obsahuje rod *Salmonella* jediný druh, a to *Salmonella enterica*.^(21,23)

Salmonely jsou původci tyfu, paratyfu a salmonelóz. Břišní tyfus a skupina paratyfů jsou výhradně lidské infekce, které se přenášejí kontaminovanými potravinami a vodou nebo přímým kontaktem s nemocným jedincem nebo bacilonosičem. V České republice je v současné době výskyt tyfu a paratyfů zcela ojedinělý, pokud se vyskytne, jedná se převážně o importovaná onemocnění. Salmonelózy patří k nejčastějším bakteriálním střevním infekcím nejen u nás, ale i ve světě. Salmonely mohou vyvolat několik forem infekce, od zcela asymptomatické přes gastroenteritickou formu až po bakteriémii s horečkou, jejímž důsledkem může být vznik extraintestinálního ložiska.⁽²¹⁾

Z pohledu transfuzní medicíny je infekce způsobená salmonellou významná vzhledem k tomu, že v průběhu onemocnění salmonelly poměrně často pronikají nejen do submukózy, lymfatických cest, ale i do krevního oběhu a mohou vyvolat krátkodobou bakteriémii, ale i septický stav.

5.2.6.6 Campylobacter

Bakterie rodu Campylobacter jsou malé, pohyblivé gramnegativní tyčky. V přírodě jsou velmi rozšířené a většina z nich je adaptována na podmínky, které jsou charakteristické pro trávicí trakt teplokrevných živočichů. Jsou však odolné i při tzv. „chladničkových“ teplotách, tedy teplotách mezi cca 2 – 8°C, při kterých tak mohou přežívat ve vodě, mléce a potravinách i několik týdnů.⁽²¹⁾

Campylobakteriózy jsou celosvětově rozšířené zoonózy. Rod Campylobacter zahrnuje 18 druhů, 11 z nich může vyvolat onemocnění u lidí. Největší význam má Campylobacter jejuni, který se běžně vyskytuje především u drůbeže. K přenosu infekce dochází alimentární cestou (požití nedostatečně zpracovaného kontaminovaného masa), k přenosu infekce mezi lidmi dochází jen zcela výjimečně. Klinicky se infekce Campylobacterem projevuje jako akutní enterokolitida.⁽²¹⁾

Vzhledem k tomu, že Campylobacter jejuni je potenciálně invazivní patogen, je významný i z pohledu transfuzní medicíny. Doporučuje se věnovat pozornost těm údajům v anamnéze potenciálních dárců krve, které by mohly znamenat riziko přenosu infekce Campylobacterem.

5.2.6.7 Streptococcus

Do rodu *Streptococcus* patří velké množství druhů, které se vyskytují u člověka i u zvířat. Streptococcy tvoří komensální flóru, jsou to podmíněné i primární patogeny. Jedním z nejvýznamnějších patogenů člověka je *Streptococcus pyogenes*. *Streptococcus pyogenes* způsobuje akutní bakteriální pharyngitidu, kožní i systémová onemocnění, je příčinou celosvětově významné morbidity a mortality. K přenosu infekce Streptococcem dochází kapénkovou cestou a přímým i nepřímým kontaktem.⁽²¹⁾

Stejně jako *Campylobacter*, je i *Streptococcus* potenciálně invazivní patogen, při propouštění potencionálního dárce k odběru se tedy doporučuje věnovat pozornost těm údajům v anamnéze, které by mohly souviset se streptokokovou infekcí.

5.2.6.8 Staphylococcus

Bakterie rodu *Staphylococcus* jsou grampozitivní nepohyblivé a nesporulující koky, typicky uspořádané do shluků ve tvaru hrozu.

Jejich charakteristickým rysem je úzká vazba na člověka, žijí jako komensálové na povrchu sliznic a jsou potenciálně invazivně patogenní. Ze všech stafylokoků je nejvíce virulentní *Staphylococcus aureus*, který kolonizuje sliznice a kůže jako součást běžné rezidentní flóry, může ale způsobit i těžké, život ohrožující infekce.

U 20-40% jedinců bývá intermitentně pozitivní asymptomatické nosičství. K přenosu infekce dochází kapénkovou cestou a kontaktem. Vstupní branou infekce je obvykle porušená kůže nebo sliznice. *Staphylococcus aureus* může způsobit řadu různě závažných onemocnění od impetiga přes různá hnisavá postižení kůže, vlasových folikulů, infekce kostí a kloubů, pneumonie, sepse až po stafylokokový syndrom toxického šoku nebo stafylokokový syndrom opařené kůže.⁽²¹⁾

Výše uvedené patogeny a mnohé další jsou uváděny jako původci sepse související s podáním krve a krevních složek (transfuzních přípravků). Proto je třeba myslet na to, že u potenciálních dárců krve může být v čase odběru přítomna krátkodobá bakteriémie v důsledku mírné gastrointestinální infekce nebo v důsledku malého zákroku v orofaciální oblasti, zejména po extrakci zubu anebo i jako důsledek drobného poranění.

5.2.7 Původci exogenní bakteriální kontaminace

K exogenní bakteriální kontaminaci dochází tehdy, pokud se bakterie dostane do odběrové soupravy během venepunkce, v průběhu odběru nebo v době po ukončení odběru tj. během zpracování, skladování a transportu krve nebo jejích složek (transfuzních přípravků).

Nejčastěji dochází k exogenní kontaminaci během venepunkce, kdy je důvodem neúčinná nebo dokonce opomenutá dezinfekce kůže v místě venepunkce.

Správná a účinná dezinfekce kůže před vlastní venepunkcí je zlatým vitálním standardem v rámci procesu odběru krve a krevních složek, který nelze ignorovat. Exogenní patogeny (patogeny z okolního prostředí) jsou všeobecně častou příčinou bakteriální kontaminace transfuzních přípravků skladovaných při vyšších teplotách, tedy zejména koncentrátů trombocytů. Exogenní patogeny jsou schopny při tzv. pokojové teplotě skladování (20-24°C) rychlého množení a produkce velkého množství toxinů. Z těchto důvodů mohou být exogenní patogeny příčinou potransfuzních septikémií.

5.2.7.1 Pseudomonas

Rod *Pseudomonas* se řadí ke gramnegativním aerobním tyčkám, vyskytuje se v odpadních vodách, v půdě, ve stolici domácích zvířat i lidí. Kolonizuje sliznice, hlavně respiračního a močového traktu u imunosuprimovaných jedinců. Ve velkém množství se může vyskytnout v nemocničním prostředí, kde kontaminuje dýchací přístroje, nebulizátory a katetry. Kmeny vyvolávající nemocniční infekce jsou obvykle vysoce virulentní a rezistentní na antibiotika. U zdravého člověka ve velmi kontaminovaném prostředí může dojít ke kolonizaci, ale nevznikne onemocnění. Onemocnění vzniká u imunosuprimovaných jedinců s defekty fagocytózy.⁽²²⁾

5.2.7.2 Serratia

Rod *Serratia* se řadí ke gramnegativním fakultativně anaerobním tyčkám. *Serratia marcescens* je jediným významným zástupcem tohoto rodu.

Může být součástí fyziologické střevní flóry, ale více je rozšířena v zevním prostředí. Většina infekcí je exogenního původu, kdy je nejčastější příčinou onemocnění porucha fyziologických bariér ve spojení s nedostatečnou hygienou. Klinicky se infekce způsobená *Serratii marcescens* projevuje jako sepse, osteomyelitida, infekční artritida, endoftalmitida, meningitida nebo endokarditida.⁽²¹⁾

5.2.7.3 Staphylococcus

Rod *Staphylococcus* byl již zmíněn v kapitole 5.2.6.8. v souvislosti se vznikem endogenních bakteriálních kontaminací transfuzních přípravků.

5.2.8 Rickettsie

Rickettsie jsou aerobní gramnegativní bakterie. Většina z nich jsou obligatorní intracelulární energetiční paraziti (využívají ATP hostitelské buňky, dokud je k dispozici). Některé druhy rickettsií jsou pro člověka patogenní. Přirozenými hostiteli a tím i přírodním rezervoárem většiny patogenních druhů rickettsií jsou obratlovci (hlodavci, psi, jeleni, srnci, ovce, kozy, skot) včetně člověka. Hostiteli rickettsií mohou být i roztoči nebo larvy komárů.

Vektorem jsou pak různí členovci. Infekce hostitele provázená rickettsiemi může u infikovaných obratlovců probíhat i asymptomaticky, což je významná skutečnost z pohledu transfuzní medicíny. Symptomatická infekce se klinicky projevuje jako tyfové onemocnění nebo jako exantémová (purpurová) horečka.⁽²¹⁾

K přenosu rickettsiové infekce transfuzí krve v extrémně vzácných případech dochází. Byl však pouze prokázán přenos Q-horečky a Horečky Skalistých hor. K přenosu infekce transfuzí může dojít pouze v případě asymptomatického průběhu infekce, ale protože infekce ve většině případů probíhá jako symptomatická, není potenciální dárce propuštěn k odběru.⁽¹⁵⁾ Testy k diagnostice rickettsiové infekce jsou sice k dispozici, ale vzhledem k jejich náročnosti nejsou vhodné pro screening u dárců krve.

5.2.9 Protozoa

Protozoa (Prvoci) jsou jednobuněčné organizmy, jejichž buňka obsahuje pravé jádro. U člověka se uplatňují jako parazité střevního traktu, urogenitálního traktu, centrálního nervového systému, jako parazité krevního a lymfatického systému a jako parazité tkání v nejrůznějších orgánech.⁽²⁵⁾

5.2.9.1 Plasmodia

Plasmodia jsou původci malárie. Rozlišujeme čtyři druhy plasmodií: *Plasmodium falciparum*, které způsobuje tropickou malárii, *Plasmodium vivax* a *Plasmodium ovale* jsou původci malárie třídní, terciány a konečně *Plasmodium malariae*, které způsobuje malárii čtyřdní, kvartánu. Plasmodia mají složitý vývojový cyklus, svůj vývoj dokončují v samicích komára rodu *Anopheles*.

Člověk slouží parazitu jako mezipřenositel a nakazí se v období, kdy jsou plasmodia ve stádiu sporozoitů obsažené ve slinných žlázách komára. Při sání komára jsou pak sporozoity inokulovány do krevního oběhu. U člověka dochází k sérii rozmnožovacích cyklů, z nichž první nebo několik dalších probíhá asymptomaticky v buňkách jaterního parenchymu, kde mohou parazité dlouhodobě přežívat. Odtud infikují erythrocyty, ve kterých probíhají další, časově synchronizované rozmnožovací cykly. Erythrocyty naplněné parazity praskají a právě tehdy dochází k typickému malarickému záchvatu. Rozmnožovací cykly probíhají u různých druhů s různou časovou periodicitou. Této periodicitě odpovídá frekvence horečnatých záchvatů.

Po určité době se v krvi objevují sexuální stadia parazita (gametocyty), která zahajují další vývoj plasmodií v komárovi po nasátí infikované krve.⁽²⁶⁾

Plasmodia se vyskytují hlavně v tropech a subtropích, ale jejich výskyt zasahuje i do mírného pásma. Případy všech druhů malárie se objevují i v mírném pásmu, kam mohou být importováni jedinci nakaženými v malarických oblastech nebo komáry importovanými letadly (tzv. letištní malárie).⁽²⁶⁾

Základem diagnostiky malárie je mikroskopický nález plasmodií v krevním nátěru nebo v tlusté kapce, obvykle barvených Giemsovým barvivem.⁽²⁶⁾

Z životního cyklu plasmodií je zřejmé, že malárii lze transfuzí krve přenést. Proto je u potenciálních dárců krve věnována velká pozornost jejich cestovatelské anamnéze a u jedinců, kteří uvádějí pobyt v malarických oblastech je odběr odložen.

V České republice a v ostatních evropských státech není diagnostika malárie zařazena do screeningu infekčních markerů u dárců krve. V zemích mimo Evropu není diagnostika malárie u dárců krve také běžně prováděna.

Diagnostika plasmodií v tlusté kapce je sice možná, ale vzhledem k různé míře parazitémie u různých jedinců a nutnosti vyšetřování velkého množství dárců krve, není diagnostika malárie vhodná pro rutinní vyšetřování potenciálních dárců krve.

5.2.9.2 Trypanosoma cruzi

Trypanosoma cruzi, původce Chagasovy choroby, je štíhlý bičíkovec, který se vyskytuje ve dvou formách. V krevním řečišti, kde se nemnoží, se vyskytuje v bičíkaté formě a v bezbičíkaté oválné formě se vyskytuje uvnitř buněk různých tkání, kde se množí. Trypanosoma cruzi je nejvíce rozšířena v jižní a střední Americe. V Latinské Americe je výskyt Chagasovy choroby endemický a její výskyt stoupá i v jižních státech USA díky imigrantům, kteří přicházejí z Latinské Ameriky do USA hledat práci.⁽¹⁵⁾

Přenašečem Trypanosomy cruzi jsou krev sající ploštice, v jejichž střevě se parazit množí a vyvíjí se. K přenosu infekce dochází kontaminativně, vetřením infekčních stadií obsažených ve výkalech ploštice do kožní oděrky nebo do oční spojivky. Vzhledem k charakteru životního cyklu Trypanosom je možný i přenos transfuzí krve, protože množení parazitů ve tkáních v akutním stádiu infekce je často asymptomatické.⁽²⁶⁾

Z pohledu transfuzní medicíny je důležité identifikovat jedince, kteří jsou riziková vzhledem k expozici infekci, jejímž původcem je Trypanosoma cruzi (příchod z endemických oblastí, cestovatelská anamnéza) a neakceptovat je jako dárců krve.

5.2.9.3 Toxoplazma gondii

Toxoplazma gondii, původce toxoplasmózy, je parazit se složitým vývojovým cyklem, člověk je pouze jedním z mnoha možných mezipřenositelů parazita. Většina lidských infekcí získaných mimo graviditu je asymptomatická a benigní, i když pravděpodobně vždy dochází ke generalizované infekci. Diagnostika toxoplasmózy je serologická.⁽²⁶⁾

Vzhledem k tomu, že byly popsány případy přenosu toxoplasmózy transfuzí u imunosuprimovaných jedinců i s fatálními důsledky, je z pohledu transfuzní medicíny onemocnění významné. K přenosu onemocnění transfuzí krve došlo v období přítomnosti Toxoplasmy gondii v leukocytech.⁽¹⁵⁾

Skutečnost, že i když se po proběhlém akutním onemocnění dají prokázat cirkulující protilátky, Toxoplazma gondii dále perzistuje v leukocytech a je tak příčinou latentní infekce s možností reaktive, je argumentem pro podání deleukotizovaných transfuzních přípravků alespoň imunosuprimovaným pacientům.

V České republice není testování na známky infekce Toxoplasmou gondii zařazeno do screeningu infekčních markerů u dárců krve.

5.2.9.4 Babesie

Babesie jsou velmi drobní parazité erytrocytů, ve kterých probíhá jejich dělení, po kterém pak napadají další erytrocyty. Rozlišujeme Babesii divergens, která je spolu s Babesii bovis parazitem skotu, hlavně v teplejších klimatických oblastech, a Babesii microti, která je kosmopolitním parazitem drobných hlodavců (myší, myšic, hrabošů). Babesie způsobují onemocnění babesiózu, která se přenáší sáním infikovaného klíštěte nebo i vetřením infikovaného rozdrceného klíštěte do oděrky či spojivky.⁽²⁶⁾

Babesia divergens a Babesia bovis způsobují rychle progredující a obvykle smrtelné onemocnění, které se klinicky projevuje horečkou, anémií, ikterem a renálním selháním a to pouze u jedinců po splenectomii.⁽²⁶⁾

Babesia microti způsobuje mírnou formu onemocnění, které se klinicky projevuje únavou, horečkou, bolestmi hlavy, kloubů a svalů a to u osob s intaktní slezinou.⁽²⁶⁾

Babesióza je sice obvykle symptomatické onemocnění, ale klinicky se může projevovat i velmi mírnými příznaky, takže přenos onemocnění transfuzí krve je možný, zejména když místem replikace parazita jsou erytrocyty.

Studie s *Babesií microti* prokázaly, že *Babesia microti* může přežívat ve skladované krvi (v chladu při běžných skladovacích podmínkách) až jeden měsíc, je tedy rizikem pro pacienty, kterým je podána transfuze erytrocytů od infekčního asymptomatického dárce krve.⁽¹⁵⁾

Vzhledem ke skutečnosti, že testování dárců krve na známky babesiózy není možné, je úkolem zařízení transfuzní služby provádět výběr dárců krve tak, aby se riziko přenosu babesiózy transfuzí minimalizovalo.

5.2.9.5 Leishmanie

Leishmanie jsou malí bičíkovci, přenášení na člověka sáním drobného hmyzu, v jehož zažívacím ústrojí prodělávají Leishmanie vývoj. V teplokrevných obratlovcích včetně člověka žije parazit výlučně uvnitř makrofágů, kde se množí. Po prasknutí infikovaných makrofágů jsou uvolnění parazité fagocytováni dalšími makrofágy, jejichž proliferaci parazit zároveň podporuje. Leishmanie se vyskytují v teplých oblastech mírného pásma, v tropech a subtropích.⁽²⁶⁾

Charakter onemocnění je velmi individuální, záleží na vlastnostech parazita a na stavu imunity infikovaného jedince. Klinicky nejvýznamnější je leishmanióza viscerální, která se projevuje horečkou, hepatosplenomegalií, lymfadenopatií, anémií, leukopenií a kachexií. Onemocnění se diagnostikuje mikroskopicky nebo kultivačně z kožních afekcí nebo orgánových biopsií. U viscerální formy se dají prokázat specifické protilátky.⁽²⁶⁾

Z hlediska importu do České republiky je pak významná viscerální dětská leishmanióza, která se vyskytuje především v dětské populaci ve Středomoří.

Ze severní Afriky může být importována kožní leishmanióza v podobě tzv. suchého vředu. V podobě tzv. vlhkého vředu k nám může být nákaza importována z polopouštních oblastí Blízkého Východu nebo ze západní Asie.⁽²⁶⁾

Vzhledem k vlastnostem parazita existuje v endemických oblastech potenciální riziko přenosu onemocnění transfuzí krve. Ale protože parazitémie je většinou přechodná a mírná, je riziko nízké.⁽¹⁵⁾

Stejně jako v případě babesiózy není testování dárců krve na známky leishmaniózy možné, pro minimalizaci přenosu infekce transfuzí je tedy opět klíčový výběr dárců krve.

5.2.10 Priony

Priony jsou bílkoviny, jež jsou normálně přítomny v organismu v tzv. α -konfiguraci. V tomto případě je základem molekuly α -helix. Vlivem některých okolností se tato struktura může přesmyknout do rovinného uspořádání (β -konfigurace), čímž původní molekula získá jiné vlastnosti.⁽²⁷⁾

Priony způsobují u lidí i u zvířat vzácná onemocnění, tzv. transmisivní spongiformní encefalopatie. Priony neobsahují nukleovou kyselinu a protože jsou vlastními proteiny těla hostitele, nevyvolávají žádnou imunologickou obrannou reakci. Rozlišujeme dva typy PrP⁴⁰ (prionových proteinů): prionový protein C (celulární, senzitivní vůči proteázám, PrP^C), který je normálním, fyziologicky se vyskytujícím membránovým glykoproteinem buněk nervového systému a lymfatické tkáně a prionový protein PrP^{Sc} (scrapiový, rezistentní vůči proteázám), což je patogenní izoforma, která vzniká, jak již bylo zmíněno, změnou prostorového uspořádání proteinového řetězce, ve kterém klesá podíl α -helixové struktury a přibývá β -struktury.⁽²⁷⁾

Existují dva základní způsoby přenosu: alimentární – požitím potravy obsahující infekční priony a iatrogenní – lidským růstovým hormonem nebo gonadotropiny získanými z hypofýz zemřelých osob.

⁴⁰ Prionový protein

Typickým znakem prionových chorob je odchýlný metabolismus PrP a jeho následné hromadění. Existují tři možné způsoby vzniku prionových chorob – dědičná, sporadická a infekční.

V případě dědičných prionových chorob dochází k tvorbě patologického proteinu následkem mutace genu pro PrP. U sporadických prionových chorob dochází ke spontánní konverzi fyziologického PrP na jeho patologickou formu a konečně u získaných (infekčních) prionových chorob se normální prion dostává do kontaktu se získaným patologickým prionem, který navodí změnu jeho prostorového uspořádání.

Klinicky se onemocnění projevuje jako subakutní nezánettivé degenerativní onemocnění mozku s rychle progredující demencí, svalovými křečemi a změnami na EEG⁴¹. Typická pro onemocnění je dlouhá inkubační doba (většinou mnoho let).

Zájem odborné transfuziologické veřejnosti o prionové choroby se zvýšil po roce 1996, kdy se poprvé ve Velké Británii objevila nová varianta Creutzfeldovy – Jakobovy nemoci, která u člověka pravděpodobně vzniká po nákaze bovinními priony u geneticky vnímavých jedinců.⁽²⁷⁾

Je zřejmé, že vCJD⁴² (varianta Creutzfeldovy – Jakobovy nemoci) je lidská forma BSE (bovinní spongiformní encefalopatie), která vzniká u člověka po požití masa krav nemocných BSE. V souvislosti s tím vyvstala otázka, zda je možný přenos vCJD krví, ale názory na možnost přenosu vCJD transfuzí se i v současné době různí. Byl sice publikovaný ojedinělý případ přenosu vCJD transfuzí, ale ani u tohoto případu se nepodařilo jednoznačně prokázat, že příčinou onemocnění je přenos původce onemocnění transfuzí. Kauzalita přenosu vCJD transfuzí ani není odbornou veřejností všeobecně akceptována. Ačkoli riziko přenosu vCJD transfuzí není známo, doporučuje se jak v USA, tak i v Evropě nepřijímat jako dárce krve jedince, kteří pobývali v letech 1980-1996 více než 6 měsíců ve Velké Británii a ve Francii.⁽¹⁴⁾

V České republice je toto doporučení zařízeními transfuzní služby také všeobecně akceptováno.

⁴¹ Elektroencefalogram

⁴² varianta Creutzfeldovy – Jakobovy nemoci

6 Screening infekčních markerů u dárců krve

Tato kapitola je věnována způsobům, které lze použít pro diagnostiku infekčních markerů u dárců krve v praxi. Podrobněji se také zabývá analýzou jednotlivých možností přímého a nepřímého průkazu patogenů v lidském organismu.

6.1 Laboratorní diagnostika infekčních nemocí u dárců krve – úvod do problematiky

Nejspolehlivější metodou diagnostiky infekčních onemocnění je průkaz původce spolu s podrobným fyzikálním vyšetřením. Při obtížnosti přímého zjištění patogenního agens (např. pro jeho kultivační nároky, nízkou koncentraci ve vyšetřované tělesné tekutině, nedostupnost cílových tkání apod.) je ve většině případů používán průkaz nepřímý, a to pomocí dynamiky specifických protilátek. Kvalifikované zhodnocení dynamiky hladin protilátek je hlavní diagnostickou metodou u mnoha infekčních onemocnění.⁽²⁸⁾

Obecné principy diagnostiky infekčních chorob se využívají i v transfuzní medicíně, kde je diagnostika latentních infekcí u dárců krve jednou z priorit. V krvi dárců lze zachytit infekční agens buď na úrovni celého mikroorganismu, popř. jeho antigenních determinant na základě záchytu specifických protilátek – tedy metodou nepřímou nebo pomocí přímého stanovení na úrovni nukleových kyselin (NAT⁴³- Nucleic Acid Testing). Nevýhodou nepřímé metody je skutečnost, že záchyt specifických protilátek v krvi dárce pouze znamená, že dárce krve byl s tou kterou infekcí v kontaktu nebo se jedná o protilátky postvakcinační a neznamena tak vždy infekciozitu dárce. V případě infekcí HIV, HBV a HCV však vzhledem k jejich biologické povaze průkaz specifických protilátek znamená vždy potenciální riziko infekce.

⁴³ Nucleic Acid Testing

6.2 Vyšetření krevního obrazu

Laboratorní diagnostika infekčních chorob u dárců krve zahrnuje i posouzení výsledků vyšetření krevního obrazu, protože bakteriální, virové a parazitární infekce mohou vést i k útlumu krvetvorby.

Pro bakteriální infekce je typická leukocytóza s neutrofilii (od 12×10^9 el/l s posunem doleva), naopak leukopenie s neutropenií, granulocytopenií mohou být známkou virových onemocnění. Pozornost je třeba věnovat i eosinofilii, která provází některá alergická onemocnění a parazitózy. Eozinofilie může být také jedním z prvních projevů Hodgkinovy choroby. V neposlední řadě je třeba sledovat i počet trombocytů, protože trombocytopenie je častá např. u prvních malarických záchvatů neimunních osob, je také charakteristická pro akutní fázi lehkých infekčních nemocí, která většinou nemají klinické příznaky.⁽²⁸⁾

6.3 Přímé vyšetřovací metody využívané pro screening infekčních markerů u dárců krve

Přímo lze prokázat patogeny např. v krevních elementech, ale přímé vyšetřovací metody využívané pro screening infekčních markerů u dárců krve jsou založeny na testování přítomnosti virových nukleových kyselin v krvi dárců krve a krevních složek.

6.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR⁴⁴)

Polymerázová řetězová reakce (PCR) patří k základním metodám diagnostiky DNA. Jde vlastně o enzymatickou amplifikaci vybraných úseků DNA v cyklické reakci o třech teplotních fázích za použití termostabilní DNA polymerázy.

⁴⁴ Polymerázová řetězová reakce

Popis jednotlivých fází :

- 1) Dvouvláknová DNA je nejprve v první fázi denaturována na dvě jednovláknové templátové molekuly DNA. Tato fáze je označována jako denaturační, používané teplotní rozmezí při této fázi leží mezi 92-98°C v závislosti na aplikaci (optimálně při 95°C). První fáze probíhá do 15-ti sekund (pro fragmenty menší než 15kb), jsou-li požadovány větší fragmenty DNA, 30 sekund až 1 minutu.
- 2) Následně dochází ve druhé fázi k hybridizaci známých oligonukleotidových sond „primerů“ na obě testované templátové DNA. Hybridizační fáze probíhá při teplotě, která se rovná denaturační teplotě duplexu templátové DNA s primerem minus 12°C, obvykle v rozmezí 50-55°C, nízká teplota podstatně snižuje specifitu, vysoká teplota zamezí amplifikaci. Pro úspěšnou amplifikaci templátových DNA ve třetí fázi není nutné při vlastní hybridizaci znát nukleotidovou sekvenci celého úseku této DNA, musí být známa alespoň sekvence krátkých úseků na obou koncích templátové DNA, kam oba primery hybridizují.
- 3) Ve třetí, tedy poslední fázi (amplifikační fáze), probíhá syntéza nového komplementárního řetězce vždy ve směru 5'→ 3', reakce je katalyzována termostabilní DNA-polymerázou (např. často používanou Taq polymerázou). Termostabilní polymerázy musíme při PCR používat proto, protože na začátku každého cyklu je třeba denaturovat templátovou DNA vysokou teplotou, která ničí normální DNA-polymerázy. Termostabilní DNA-polymerázy pocházejí z bakterií, žijících v extrémních podmínkách. Jejich proteinová struktura je evolucí upravena tak, že odolává po určitou dobu i teplotám kolem 95°C. Jak bylo již uvedeno výše, nejčastěji se používá tzv. Taq-polymeráza, nazvaná podle bakterie *Thermus aquaticus*.

Tabulka 6: Přehled termostabilních DNA-polymeráz a jejich charakteristika podle exonukleázové aktivity⁴⁵

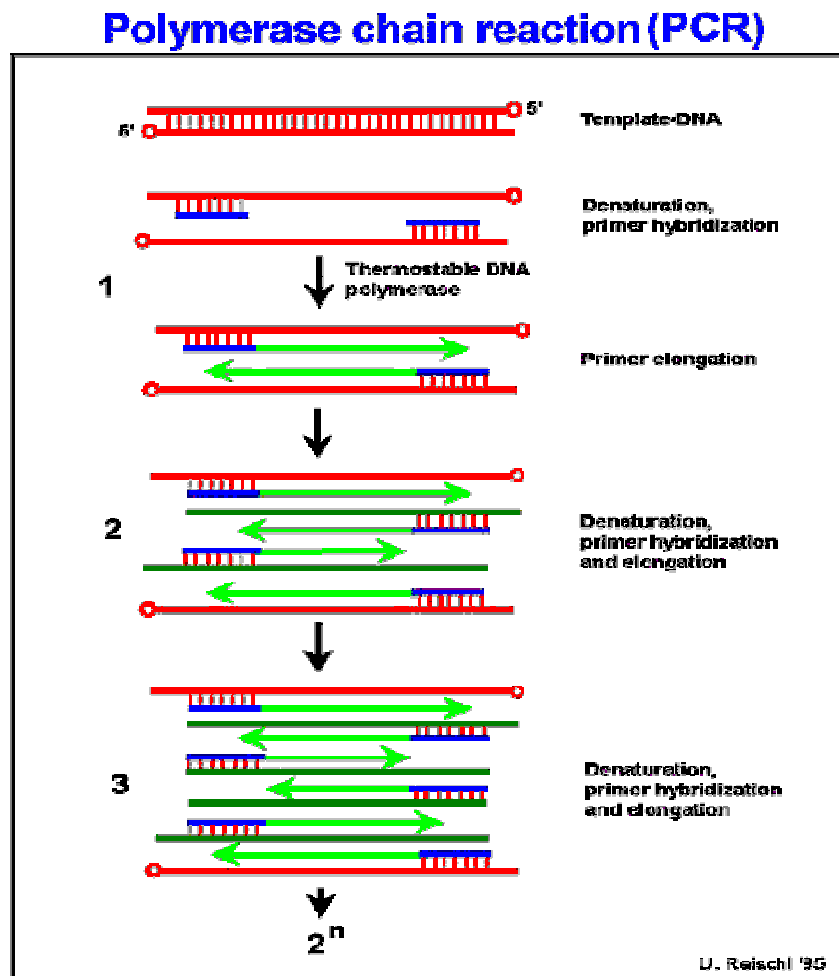
Polymeráza	5'→3' exonukleáza	3'→5' exonukleáza
Taq	ano	ne
Tfl	ano	ne
Tbr	ano	ne
Tth	ano	ne
Stoffelův fragment	ne	ne
Tli	ne	ano
Pfu	ne	ano
Pwo	ne	ano
U1 Tma	ne	ano

Během prvního cyklu pokračuje syntéza nového vlákna dále až za sledovanou sekvenci, ale následné cykly již amplifikují převážně pouze úsek mezi dvěma oligonukleotidovými sondami (primery). Amplifikace probíhá v teplotním rozmezí mezi 70 – 74°C (při použití primerů bohatých na obsah nukleotidů G a C je někdy vhodná teplota 80°C) a její délka je opět závislá na velikosti požadovaných fragmentů nově syntetizované DNA - pro fragmenty do 1kb je to 30 sekund až 1 minuta, pro úseky dlouhé 6-10 kb je potřebná doba cca 15 minut.⁽³⁴⁾

Následná detekce produktů PCR reakce může probíhat mnoha způsoby v závislosti na aplikaci, např. elektroforézou, v reálném čase s fluorescenčním značením apod.

⁴⁵ Zdroj: PRŮŠA, R., MACEK ml., M. *Molekulární diagnostika*. In: ZIMA, T., et al. *Laboratorní diagnostika*, Galén, 2007, s.686, tab.32.3.

Obrázek 4: Obecné schéma polymerázové řetězové reakce⁴⁶



6.3.2 Multiplexová polymerázová řetězová reakce (Multiplex PCR)

Multiplex PCR je velmi výkonná modifikace PCR, která umožňuje větší počet testování na základě jediné amplifikační reakce. Při této metodě testování se využívá větší počet primerů, které hybridizují s různými úseky templátové DNA, takže během následné reakce dochází k jejich současné amplifikaci a vzniku produktů o různé délce a sekvenci.⁽³⁴⁾

⁴⁶ Zdroj: <http://www.bioscience.org/1996/v1/e/reischl1/htmls/3.htm#fig3>

6.3.3 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR⁴⁷), Polymerázová řetězová reakce s využitím reverzní transkripce

RT-PCR je velmi hodnotná metoda k analýze genové exprese, detekci genetických nemocí, ale v neposlední řadě i k detekci infekčních agens, které svou genetickou informaci nesou ve formě molekuly RNA, čehož se s úspěchem využívá při screeningu infekčních virových markerů u dárců krve a krevních složek. RT-PCR má nezastupitelný význam při analýze mRNA. Její sekvenci lze prostřednictvím reverzní transkripce přepsat do cDNA a následně lze tuto cDNA amplifikovat pomocí PCR.⁽³⁴⁾

6.3.4 TaqMan

V kontextu screeningu infekčních markerů u dárců krve a krevních složek metodami testování nukleových kyselin nelze nezmínit metodu TaqMan. V této kapitole je metoda zmíněna stručně, detailnímu popisu bude věnována příslušná kapitola v praktické části. Metoda TaqMan je komerční systém, který je možno použít jak pro genotypizaci, tak i pro stanovení genové dávky. Jde o PCR s použitím reverzní transkriptázy v reálném čase, při které je pro detekci produktů amplifikace použita fluorescence. Změny jediného nukleotidu v PCR amplikonech lze detekovat specifickou komplementární hybridizací sondy, která má připojen jak fluorochrom, tak i tzv. zhášec fluorescence („quencher“). Pokud dojde ke specifické hybridizaci, je quencher odštěpen a navázaný fluorochrom je standardně detekovatelný na základě specifické vlnové délky. Vzhledem k tomu, že lze použít různě barevné fluorochromy, je možno využít tento typ vyšetření v multiplexním formátu.⁽³⁴⁾

6.3.5 Přímý průkaz patogenů v krevních elementech

Pro úplnost je třeba uvést i možnost přímého průkazu patogenů v krevních elementech.

⁴⁷ Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

Po obarvení krevního nátěru Giemsovým barvivem jsou v erytrocytech mikroskopicky prokazována různá vývojová stadia malarických plasmodií, v endemických oblastech i babesii⁽²⁸⁾.

Toto vyšetření se v zařízeních transfuzní služby v rámci předodběrových vyšetření dárců krve a poodběrových vyšetření odebrané krve běžně neprovádí.

6.4 Nepřímé vyšetřovací metody využívané pro screening infekčních markerů u dárců krve

Metodami první volby pro testování infekčních markerů u dárců krve jsou nepřímé vyšetřovací metody. V České republice jsou využívány v zařízeních transfuzní služby celoplošně.

Jedná se o sérologické metody, založené na detekci interakce antigenu s protilátkou. Sérologické screeningové metody jsou postaveny buď na detekci neoznačeného antigenu a/nebo protilátky nebo na detekci označeného antigenu a/nebo protilátky.

6.4.1 Screeningové vyšetřovací metody s neoznačeným antigenem a/nebo protilátkou

Podstatou těchto vyšetřovacích metod je detekce výsledné precipitace nebo aglutinace, ke které dochází na základě reakce antigenu s protilátkou. A to buď v roztoku nebo v gelu. V zařízeních transfuzní služby se však tyto metody vzhledem k nízké citlivosti detekce (citlivost precipitačních metod je 30 µg/ml a citlivost aglutinačních metod je 1 µg/ml) pro screening infekčních markerů nevyužívají.

6.4.2 Screeningové vyšetřovací metody s označeným antigenem a/nebo protilátkou

Tyto screeningové vyšetřovací metody mohou detekovat i nízké koncentrace antigenu a protilátky, citlivost se pohybuje okolo 1pg/ml a jsou proto v zařízeních transfuzní služby využívány. Vyšší citlivosti těchto metod je dosaženo navázáním vhodné značky, která vykazuje intenzivní měřitelný signál, na jednoho z imunoreaktantů ještě před uskutečněním jejich interakce.

K vlastnímu označení se využívají některé enzymy (např. křenuv peroxidasa, alkalická fosfatasa, glukosa-oxidasa, beta-D-galaktosidasa, lysozym, malátdehydrogenasa, glukosa-6-fosfátdehydrogenasa), fluorescenční a chemiluminiscenční látky (např. fluorescein-isothiokyanát, luminol) popř. radionuklidy (např. ^{125}I a ^{131}I pro proteinové antigeny, tritium nebo ^{14}C pro nízkomolekulární látky). Imunoanalytické metody se značeným antigenem nebo protilátkou se v zařízeních transfuzní služby používají nejčastěji pro detekci v roztoku, označené protilátky lze ale využít i k lokalizaci odpovídajících antigenních struktur na elektroforeogramech, kdy se po elektroforetickém rozdělení směsi látek detekuje specifický antigen přímo v gelu nebo – pokud jsou použity imunoblotovací techniky - až po otištění stop rozdělených látek na speciální detekční membránu.⁽³⁶⁾

Tuto skupinu imunoanalytických metod lze rozdělit na homogenní a heterogenní. Homogenní imunoanalytické metody jsou charakteristické tím, že celkový signál značky (např. enzymová aktivita nebo fluorescence nebo radioaktivita) v reakčním objemu před reakcí antigenu s protilátkou je jiný než je aktivita signálu komplexu konjugát-protilátka. Při užití homogenní imunoanalýzy je intenzita signálu ovlivněna navázáním protilátky na antigen, intenzita signálu může být proto monitorována během reakce v celém reakčním roztoku.

Naproti tomu pokud k detekci antigenu a/nebo protilátky použijeme heterogenní analýzu, kdy intenzita signálu značky není ovlivněna reakcí antigenu s protilátkou, nejenže nemůžeme monitorovat intenzitu signálu značky v reakčním roztoku, ale musíme po ukončení reakce separovat značené agens vázané v imunokomplexu od značeného agens, které zůstalo volné v roztoku.⁽³⁶⁾

Vzhledem k těmto faktům jsou tedy nejčastěji v zařízeních transfuzní služby ke screeningu infekčních markerů u dárců krve využívány různé technologie na bázi enzymové homogenní imunoanalýzy, např. ELISA.

6.4.3 Enzymová imunoanalýza-ELISA⁴⁸ (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

ELISA je imunochemická reakce s enzymatickou detekcí, kdy je stanovení imunokomplexu antigen-protilátka umožněno navázáním vhodné značky, tj. enzymu na jednoho z imunoreaktantů.⁽³⁶⁾ Reakce probíhá na pevné fázi (imunoadsorbní povrch), což je upravený polystyrén ve formě mikrotitračních destiček, kuliček, hřebenů nebo pruhů. Metoda bude podrobně popsána v praktické části.

6.4.4 Kožní testy

Pro úplnost je třeba zařadit k nepřímému průkazu infekčních onemocnění i kožní testy. V minulých desetiletích byly kožní testy využívány např. k diagnostice tularémie, brucelózy, toxoplazmózy. V současné době se kožní testy využívají k diagnostice kokcidioidomykózy, histoplazmózy, leishmaniózy, lepry, parakokcidioidomykózy a tuberkulózy.⁽²⁸⁾

V transfuzní medicíně nejsou kožní testy při vyšetřování dárců krve využívány.

⁴⁸ Enzymová imunoanalýza, Enzyme Linked Immunosorbent Assay

7 Metody používané k vyšetřování (screeningu) dárců krve ve světě

Jak již bylo uvedeno výše, celosvětově panuje shoda pouze ve výběru tří klinicky významných infekcí, které jsou u dárců krve testovány. Jsou to markery HIV 1 a 2, HBV a HCV, které jsou v některých zemích eventuálně doplňovány dle epidemiologické situace o markery dalších infekcí, např. o vyšetření malárie nebo WNV. Avšak vlastní vyšetřovací metody používané k testování infekčních markerů u dárců krve jsou na různých místech světa odlišné. V této kapitole jsou zmíněny infekční markery vyšetřované u dárců krve v různých částech světa včetně metod, kterými jsou známky těchto klinicky významných infekcí vyšetřovány.

7.1 Screening infekčních markerů u dárců krve v Evropské unii

Rada Evropy (European Committee - Partial Agreement - on Blood Transfusion) stanovila pro vyšetření dárců krve jako minimální požadavek vyšetření sérologických markerů HIV, HBV a HCV – tedy vyšetření protilátek proti HIV-1 (anti-HIV-1) a HIV-2 (anti-HIV-2) včetně jejich subtypů, vyšetření protilátek proti viru hepatitidy C (anti-HCV) a vyšetření HBsAg takovou metodou, která detekuje nejméně 0,5 IU/ml HBsAg.⁽²⁰⁾

V převážné většině států Evropské unie je v současné době u dárců krve vyšetřován metodou NAT alespoň jeden infekční marker (viz tabulka č.7). V České republice není v současné době metoda NAT k vyšetřování dárců krve využívána vůbec.

Tabulka 7: Přehled vyšetření infekčních markerů u dárců krve v Evropě (stav v roce 2010)⁴⁹

	HBsAg	anti-HBc	anti-HCV	anti-HIV1/2	Ag HIV	syfilis	NAT HBV	NAT HCV	NAT HIV	anti-HTLV I/II	NAT VHA	NAT PV B-19
Belgie	X		X	X		X		X	X			
Bulharsko	X		X	X	X	X						
Česká republika	X		X	X	X	X						
Dánsko	X		X	X			X	X	X	X		
Estonsko	X		X	X	X		X	X	X			
Finsko	X		X	X	X							
Francie	X	X	X	X		X	X	X	X	X		
Irsko	X		X	X				X	X			
Itálie	X		X	X	X	X	X	X	X			
Kypr	X		X	X	X	X						
Litva	X	X	X	X		X	X	X	X			
Lotyšsko	X		X	X		X	X	X	X			
Lucembursko	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Maďarsko	X	X	X	X		X						
Malta	X	X	X	X		X						
Německo	X	X	X	X		X		X	X		X	X
Nizozemsko	X		X	X		X	X	X	X	X		
Polsko	X		X	X		X	X	X	x			
Portugalsko	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Rakousko	X		X	X		X		X	X		X	X
Řecko	X		X	X	X		X	X	X	X		
Rumunsko	X		X	X		X						
Slovensko	X	X	X	X	X	X						
Slovinsko	X		X	X	X	X	X	X	X			
Španělsko	X		X	X		X	X	X	X			
Švédsko	X	X	X	X		X				X		
Velká Británie	X		X	X		X		X		X		

⁴⁹ Zdroj: 4. Střešovický transfuzní den, 4.11.2010, Praha

7.2 Screening infekčních markerů u dárců krve v USA

Ve Spojených státech amerických je povinné nejen vyšetření HIV, HBV a HCV technikami NAT (Nucleic Acid Testing), ale je povinné i vyšetření HTLV I/II sérologickými testy a vyšetření viru západonilské horečky (WNV – West Nile Virus) v letním období technikami NAT a sérologické vyšetření na Chagasovu chorobu u dárců, kteří jsou přistěhovalci z endemických oblastí. Syfilis se v USA plošně nevyšetřuje.^(13,14)

7.3 Screening infekčních markerů u dárců krve v České republice

V České republice je na základě Vyhlášky 351 ze dne 2.12.2010, kterou se mění vyhláška č.143/2008 Sb., o stanovení bližších požadavků pro zajištění jakosti a bezpečnosti lidské krve a jejích složek., povinnost provádět při každém odběru vyšetření diagnostických vzorků získaných od dárce zahrnující

a) vyšetření k průkazu známek infekce

- virem lidského imunodeficitu typů 1 a 2 (dále jen „HIV 1 a 2“), a to metodou stanovení protilátky a antigenu p24,
- virem hepatitidy typu B (dále jen „HBV“), a to metodou stanovení povrchového antigenu,
- virem hepatitidy typu C (dále jen „HCV“), a to metodou stanovení protilátky, a
- syfilis, a to metodou stanovení protilátky

b) vyšetření krevní skupiny v systému AB0, znaku RhD a screeningové vyšetření nepravidelných protilátek proti erytrocytům, přičemž se nezávisle ověří výsledek vyšetření krevní skupiny v systému AB0; tato vyšetření se neprovádějí u suroviny pro další výrobu, nejsou-li taková vyšetření zpracovatelem požadována,

- c) podle epidemiologické situace další imunohematologická vyšetření a další vyšetření známek infekce podle specifikace transfuzního přípravku nebo suroviny pro další výrobu.

Vyhláška o „lidské krvi“ vychází z požadavků Direktivy 2002/98 EU. Nad rámec direktivy Evropské unie ukládá vyhláška vyšetření antigenu p24 HIV a vyšetření protilátek proti *Treponema pallidum*.

Nad rámec vyhlášky vyšetřují některá zařízení transfuzní služby ještě HCV-Ag, dále ALT jako známku poškození jater při hepatitidě a některá zařízení transfuzní služby vyšetřují u prvodárců i antigen HBc.

V České republice jsou stanovena i pravidla confirmace. Každý opakovaně reaktivní vzorek od dárce krve nebo jejích složek musí být odeslán ke confirmaci do Národní referenční laboratoře pro virové hepatitidy a/nebo do Národní referenční laboratoře pro syfilis a/nebo do Národní referenční laboratoře pro AIDS.⁽¹¹⁾

7.4 Další státy

V Číně jsou vyšetřovány u dárců krve markery HIV 1 a 2, HBV a HCV. NAT testování není v Číně v současné době pro účely vyšetřování dárců krve rutinně zavedeno, využívají se metody ELISA.^(37,38)

V Indii jsou dárce krve testováni na známky infekcí HIV, HBV (HBsAg), syfilis a malárie, a to metodami ELISA.⁽³⁹⁾

Japonsko jako první země na světě zavedlo v roce 1999 NAT testování infekčních markerů u dárců krve spolu s inaktivací plazmy. Japonští dárce krve jsou testováni na známky infekcí HBV, HCV a HIV.⁽⁴⁰⁾

V Austrálii se provádí testování dárců krve na známky infekcí HIV, kdy je zjišťována přítomnost protilátek anti-HIV - 1 a 2 metodou ELISA, známky infekce HIV - 1 jsou navíc testovány metodou NAT.

Dále je vyšetřován HBsAg metodou ELISA, kterou je také testována přítomnost protilátek anti-HTLV a prováděny testy na syfilis. Znamky infekce HCV jsou zjišťovány dvěma metodami. Protilátky anti-HCV jsou vyšetřovány metodou ELISA a k průkazu HCV-RNA je ale využíváno i NAT testování. Fakultativně jsou výše uvedené testy doplňovány u dárců krve a krevních složek přicházejících z rizikových oblastí o testy na malárii.⁽⁴¹⁾

8 Rozšíření standardního režimu vyšetřování virových markerů u dárců krve ve Fakultním transfuzním oddělení Všeobecné fakultní nemocnice v Praze o NAT (Nucleic Acid Testing)

Standardní algoritmus screeningu infekčních markerů imunoenzymatickou metodou CMIA byl pro účely této práce, jak již bylo zmíněno, doplněn o testování NAT (metodou RT- Multiplex Real Time PCR) na přítomnost HBV DNA, HCV RNA , HIV 1 RNA (skupin M a O) a HIV 2 RNA. Celkem bylo oběma metodami vyšetřeno 5074 vzorků od 3909 pravidelných dárců krve a krevních složek.

V praktické části je nejprve popsán způsob výběru dárců/vzorků pro účely NAT testování, parametry odběru, zpracování, skladování a manipulace se vzorky a také charakter celého vyšetřovaného souboru a režim vyšetřování na obou použitých systémech. Další dílčí kapitoly praktické části se zabývají nejprve detailním popisem použitých metod, včetně popisu vlastní práce na obou systémech, následuje podrobný přehled naměřených dat a vyhodnocení výsledků. V závěrečné části je navržen postup pro eventuální možnou studii k problematice testování NAT, která by přímo navázala na tuto práci a jejíž výsledky by mohly dále přispět k diskuzi o zavedení rutinního screeningového NAT testování v České republice. Součástí závěrečné části je i analýza resp. porovnání nákladů na léčbu pacientů, u kterých byla zjištěna jedna z testovaných infekčních chorob a nákladů na vyšetřování při zavedení NAT testování do rutinního screeningu infekčních markerů v České republice. Tyto údaje jsou pak vztaženy na teoretický počet infekcí přenesených transfuzí od dárců, kteří se nacházejí v diagnostickém okně.

8.1 Popis vyšetřovaného souboru

Pro účely této práce byly k dispozici reagenční soupravy, kontroly a spotřební materiál na testování 5074 vzorků. Výběr vlastních vzorků probíhal tak, aby testovaný soubor co nejvěrněji kopíroval charakter dárcovské populace ve FTO VFN. Vzhledem k nízké očekávané možnosti záchytu dárce v diagnostickém okně při tomto počtu vzorků byl vyšetřovaný soubor dále doplněn o skupinu vzorků, u nichž je předpokládaná pravděpodobnost reaktivity v NAT řádově vyšší. Soubor všech vyšetřovaných vzorků tedy tvoří dvě základní skupiny.

První skupina reprezentuje standardní populaci pravidelných dárců FTO VFN. Vzorky (5074 vzorků) byly získány z období přibližně 4 měsíců v první polovině roku 2008 od všech dárců krve a krevních složek, kteří přišli do FTO VFN nebo do odběrových center FTO VFN - Jihlavy, Kadaně a Chrudimi darovat plnou krev (PK⁵⁰) nebo plazmu formou aferézy (PA⁵¹). Odběry vzorků byly prováděny během vlastního odběru (PA) nebo během zpracování na výrobním oddělení FTO VFN (P⁵²). Odběr vzorku je podrobněji popsán v kapitole věnované preanalytické fázi testování. Testování první skupiny vzorků proběhlo na obou systémech – na systému Roche cobas s201 metodami NAT a na systému Abbott Architect i2000, kde byly vzorky testovány pomocí standardně používaných imunoanalytických metod.

Do druhé skupiny vyšetřovaných vzorků (řádově desítky vzorků) byly zařazeny archivní vzorky (plazma) dárců krve a krevních složek, u kterých byl výsledek NAT testování na systému Roche cobas s201 hodnocen jako reaktivní. Do této skupiny byly zařazeny i archivní vzorky dárců krve a krevních složek, kteří se v době odběru potenciálně nacházeli v diagnostickém okně (tj. jejich další odběr/vzorek byl pomocí standardně používaných imunoanalytických metod na systému Abbott Architect i2000 hodnocen jako reaktivní) a za účelem NAT testování byly tyto vzorky z archivu vyjmuty. Tato skupina vzorků byla testována na systému cobas s201 popř. pro potřeby rozšířeného testování i na dalších analytických systémech v Národní referenční laboratoři pro virové hepatitidy.

⁵⁰ Plná krev

⁵¹ Plazma z aferézy

⁵² Plazma z plné krve

Dále v Národní referenční laboratoři pro AIDS a v Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. V tabulce č.8 je v přehledu uveden soubor všech vzorků (obě testované skupiny) vyšetřených na systému cobas s201 metodou RT-Real Time PCR. Detailní rozložení souboru vzorků v procentech je uvedeno v grafech č.1 a č.2.

Tabulka 8: Přehled vyšetřovaného souboru - vzorky⁵³

CELKOVÝ POČET VZORKŮ			5074				
	%PD ⁵⁴	%OD	Počet	Muži	Ženy	%Muži	%Ženy
Aferetické odběry ⁵⁵ (FTO)	-	100	821	649	172	79,05	20,95
Odběry plné krve (FTO+OC)	8,5	91,5	4253	2801	1452	65,86	34,14
Celkem			5074	3450	1624	68	32
AFERETICKÉ ODBĚRY			821 (16,18%)				
	% FTO		Počet	Muži	Ženy	%Muži	%Ženy
Karlovo náměstí	47,99		394	322	72	81,73	18,27
Zbraslav	52,01		427	327	100	76,58	23,42
Celkem			821	649	172	79,05	34,14
ODBĚRY PLNÉ KRVE OC			3140 (61,88%)				
	% OC		Počet	Muži	Ženy	%Muži	%Ženy
Jihlava	80,48		2527	1697	830	67,15	32,85
Kadaň	13,34		419	261	158	62,29	37,71
Chrudim	6,18		194	145	49	74,74	25,26
Celkem			3140	2103	1037	66,97	33,03
ODBĚRY PLNÉ KRVE FTO			1113 (21,94%)				
	% FTO		Počet	Muži	Ženy	%Muži	%Ženy
Karlovo náměstí	57,95		645	417	228	64,65	35,35
Zbraslav	14,20		158	91	66	57,96	42,04
Výjezdové odběry	27,85		310	190	121	61,29	38,71
Celkem			1113	698	415	62,71	37,29

Legenda: Tabulka je rozčleněna dle jednotlivých typů vzorků resp. odběrů (celkový počet vyšetřených vzorků, aferetické odběry a odběry plné krve), v každé části jsou pak v jednotlivých řádcích uvedeny počty vyšetřených vzorků dle místa odběru (pracoviště FTO VFN, odběrová centra - OC⁵⁶) a pohlaví dárce, údaje jsou vyjádřeny také v procentech..

⁵³ Zdroj: Vlastní zpracování

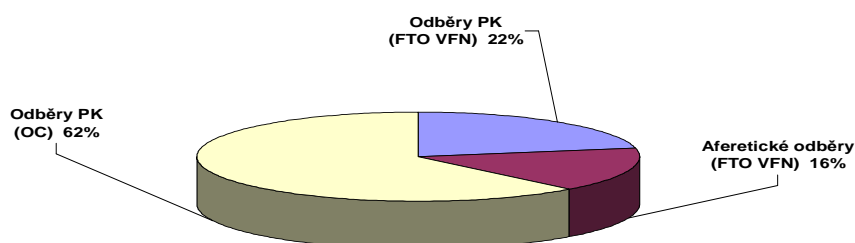
⁵⁴ Počet prvodárců (PD) a opakovaných dárců (OD) v %

⁵⁵ Aferetický odběr je odběr krevní složky pomocí přístroje (separátoru krevních složek, který většinou pracuje na principu diferenciální centrifugace), kdy je dárci odebrána plná krev, která se v separátoru oddělí na jednotlivé složky. Složka, kterou chceme odebrat, je sbírána do plastových vaků, ostatní složky jsou vráceny dárci zpět do krevního oběhu.

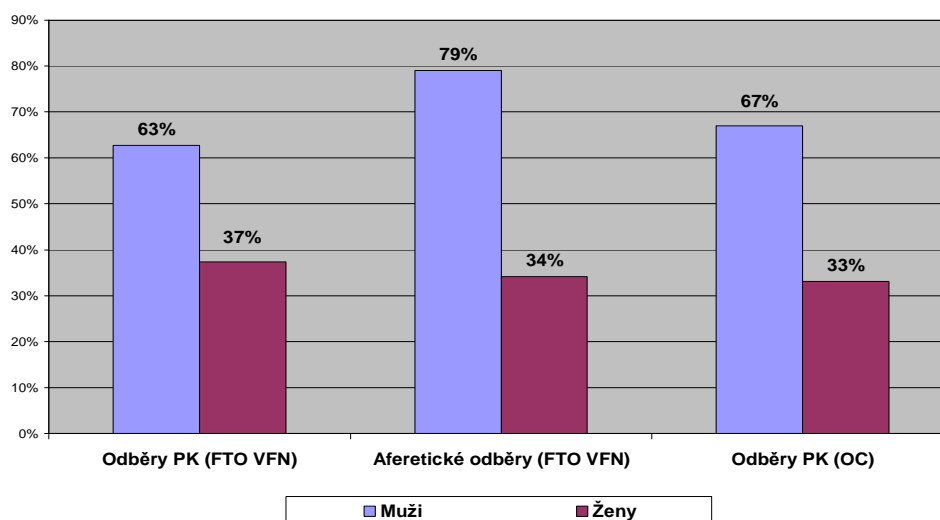
⁵⁶ Odběrové centrum

Z tabulky je patrné, že podstatnou část vzorků tvoří vzorky z odběru PK (plná krev, odběr vzorku na oddělení výroby FTO VFN), přičemž počet těchto vzorků z odběrových center je v porovnání z FTO VFN přibližně trojnásobný. Mezi dárci převažují muži - cca 65% u vzorků PK a až 80% u vzorků aferetických (viz. grafy č.1 a č.2).

Graf 1: Rozdělení vyšetřovaných vzorků dle typu odběru⁵⁷



Graf 2: Rozdělení vyšetřovaných vzorků dle pohlaví⁵⁸



⁵⁷ Zdroj: vlastní zpracování

⁵⁸ Zdroj: vlastní zpracování

Vzhledem k tomu, že část souboru vyšetřovaných vzorků pochází od pravidelných dárců, kteří darovali krev nebo krevní složky v daném období opakovaně, je celkový počet testovaných dárců nižší než celkový počet testovaných vzorků. Přehled dárců testovaných pomocí NAT je uveden v následující tabulce č.9.

Tabulka 9: Přehled vyšetřovaného souboru - dárci⁵⁹

CELKOVÝ POČET DÁRCŮ		3909				
		Počet	Muži	Ženy	% Muži	% Ženy
Aferetické odběry (FTO)		448	344	104	76,79	23,21
Odběry plné krve (FTO+OC)		3461	2237	1224	64,63	35,37
Celkem		3909	2581	1328	66,01	33,99
AFERETICKÉ ODBĚRY		448 (11,46%)				
	% FTO	Počet	Muži	Ženy	% Muži	% Ženy
Karlovo náměstí	52,00	233	187	46	80,26	19,74
Zbraslav	48,00	215	157	58	73,02	26,98
Celkem		448	344	104	76,79	23,21
ODBĚRY PLNÉ KRVE OC		2520 (64,47%)				
	% OC	Počet	Muži	Ženy	% Muži	% Ženy
Jihlava	78,65	1982	1280	702	64,58	35,42
Kadaň	13,73	346	217	129	62,72	37,28
Chrudim	7,62	192	144	48	75,00	25,00
Celkem		2520	1641	879	65,12	34,88
ODBĚRY PLNÉ KRVE FTO		941 (24,07%)				
	% FTO	Počet	Muži	Ženy	% Muži	% Ženy
Karlovo náměstí	60,68	571	371	200	64,94	35,06
Zbraslav	15,30	144	84	60	58,33	41,67
Výjezdové odběry	24,02	226	141	85	62,39	37,61
Celkem		941	596	345	63,34	36,66

Legenda: Rozdělení dárců jak podle typu odběru, tak podle pohlaví se procentuálně významně neliší od rozdělení vzorků – opět převažují odběry PK (cca 88%) nad odběry aferetickými, množství dárců z odběrových center je více než dvou a půl násobné a mezi dárci je významnější část mužů (cca 65% u dárců PK a cca 77% mezi dárci aferetickými).

⁵⁹ Zdroj: vlastní zpracování

8.1.1 Preanalytická fáze

Z důvodu značné kapacity systému cobas s201 (minimální kapacita systému, která odpovídá cost&benefit je 120 vzorků v jednom běhu, doba testování je cca 3 hodiny) a množství vzorků, které jsou standardně vyšetřovány v rutinním provozu laboratoře infekčních markerů FTO VFN (průměrně 130 vzorků denně), bylo upuštěno od původního záměru provádět testování na obou systémech souběžně a v praxi tak ověřit i logistiku preanalytické a analytické fáze tj. současný odběr vzorků jak pro vyšetřování metodou CMIA, tak i metodou NAT s následnou přípravou a manipulací před testováním, dále vlastní testování oběma metodami, skladování vzorků a konečně předepsanou archivací testovaných vzorků.

Odběr vzorku plazmy pro NAT testování neprobíhal tedy po odběru a centrifugaci vzorku PK, ale po odběru PA nebo během zpracování PK (vzorky z P). Všechny odebrané vzorky byly následně skladovány a po nashromáždění dostatečného počtu vzorků (cca 5000 vzorků) bylo zahájeno vyšetřování na systému Roche cobas s201.

8.1.1.1 Odběr vzorků

Odběr vzorků pro standardní testování

Vzorky pro testování standardně používanými imunoanalytickými metodami byly odebírány vždy při vlastním odběru plné krve nebo odběru krevní složky aferézou. Vzorky byly odebírány do zkumavky s vakuovým systémem BD Vacutainer (výrobce Becton Dickinson Vacutainer Systems) o objemu 6 ml, kde jako antikoagulační činidlo je použita K₂EDTA v množství 10,8 mg.

Odběr vzorků pro vyšetření infekčních markerů **při odběru plné krve, odběru deleukotizovaných trombocytů aferézou a odběru erytrocytů aferézou** se provádí tak, že po venepunkci je první porce krve sbírána do satelitního váčku, který je součástí odběrového setu. Na konektor satelitního váčku jsou pak nasazeny odběrové zkumavky BD Vacutainer, do kterých je převeden příslušný objem plné krve k vyšetření (objem vzorku určeného k vyšetření infekčních markerů).

Použité odběrové sety:

- odběrové sety pro odběr plné krve: compoflex T2767 a composelect T4021 - výrobce Fresenius HaemoCare GmbH),
- odběrové sety pro odběr deleukotizovaných trombocytů aferézou: odběrový set 994 CFE - výrobce Haemonetics Corporation, odběrové sety C5L, S5L – výrobce Fresenius HaemoCare GmbH a odběrové sety Caridian BCT – výrobce Caridian BCT,
- odběrové sety pro odběr erytrocytů aferézou: 942 E, 944 a 948 F - výrobce Haemonetics Corporation.

Odběr vzorků pro vyšetření infekčních markerů **při odběru trombocytů aferézou** se provádí tak, že po venepunkci je první porce krve sbírána do satelitního váčku, který je součástí odběrového setu. Satelitní váček neobsahuje konektor pro připojení zkumavek, proto je nutno vždy satelitní váček oddělit od původního setu. Aby se při této manipulaci zabránilo kontaminaci transfuzního přípravku, odděluje se satelitní váček s využitím sterilní svářečky. Z odděleného satelitního váčku je pak plná krev převedena do zkumavek

Použité odběrové sety pro odběr trombocytů aferézou jsou typu 995E – výrobce Haemonetics Corporation.

Odběr vzorků pro vyšetření infekčních markerů **při odběru plazmy aferézou** se provádí tak, že po venepunkci je první porce plné krve převedena přímo do zkumavek.

Použité odběrové sety pro odběr plazmy aferézou jsou typu SC 690 + odběrový set 792 - výrobce Haemonetics Corporation.

Vzorky všech typů odběrů jsou vždy označovány čárovým kódem s identifikací dárce, objem vzorku je ve všech případech cca 6 ml. Tyto vzorky jsou po vyšetření na systému Architect i2000 archivovány (manuálně je pipetován alikvot plazmy cca 1 – 1,2 ml do mikrotitračních destiček Deep Well Plate PP 1,2 ML (výrobce Treff AG) a následně jsou zamrazovány na méně než minus 25°C a dále uchovávány při této teplotě.

Odběr vzorku pro NAT testování

Vzorky pro testování metodou NAT byly odebírány vždy po vlastním odběru a zpracování plné krve nebo po odběru plazmy aferézou. Vzorky byly odebírány do zkumavky BD Vacutainer EST Z, jednorázové sterilní plastové zkumavky (13 x 75 mm) s průsvitným uzávěrem, bez antikoagulačního roztoku (výrobce Becton Dickinson Vacutainer Systems).

Po odběru plazmy aferézou (vzorky PA) byl pro účely NAT testování vzorek odebírán (po homogenizaci obsahu hadičky a obsahu vaku s plazmou) v množství cca 3ml přímo z konektoru určeného pro odběr vzorku. Konektor je součástí odběrového setu Haemonetics č. 792 pro odběr plazmy aferézou na přístrojích MCS 3p, PCS 2 a MCS+ (výrobce Haemonetics Corporation). Během plazmaferézy byl jako antikoagulační roztok použit 4% roztok citrátu sodného (výrobce Baxter Healthcare Corporation).

Po vlastním zpracování plné krve/po separaci plazmy a erytrocytů odebrané plné krve na oddělení výroby byl pro účely NAT testování vzorek získán (po homogenizaci obsahu hadičky a obsahu vaku s plazmou) v množství cca 3ml ze segmentu vaku s plazmou (odběr probíhal po nastřížení zavařené hadičky a přenesením obsahu hadičky do zkumavky). Výchozí produkt (odebraná plná krev) byl proveden do odběrového trojvaku Compoflex T2767 (výrobce Fresenius HaemoCare GmbH). V tomto typu odběrového trojvaku je jako antikoagulační roztok použit roztok CPD (63 ml roztoku obsahuje citrát sodný, kyselinu citronovou, glukózu, dihydrogenfosforečnan sodný a vodu), jako resuspenzní roztok je použit SAG-M.

Odebrané vzorky u všech typů odběrů byly vždy označeny čárovým kódem s identifikací dárce.

Archivní vzorky laboratoří FTO VFN a vzorky karanténní plazmy - pro účely dalšího testování pomocí NAT byly použity vzorky z archivu laboratoří FTO VFN po rozmrazení (vzorek plazmy, cca 1,2 ml) a v případě potřeby také vzorky z plazem uložených v karanténě. (vzorek byl získán po rozmrazení plazmy z hadičky vaku po homogenizaci obsahu hadičky a obsahu vaku s plazmou).

8.1.1.2 Centrifugace (obě metody)

Centrifugace vzorků před testováním standardně používanými imunoanalytickými metodami (CMIA) byla prováděna v laboratoři FTO VFN na velkoobjemové centrifuze Jouan 4.22. (výrobce Jouan SA) při 3500 ot., t.j. 2350 x g) po dobu deseti minut. Vzorky pro NAT nebyly před vlastním testováním centrifugovány.

8.1.1.3 Skladování a další manipulace (CMIA)

Vzorky pro vyšetření metodami CMIA - po centrifugaci a vyšetření na laboratořích FTO byl pipetován alikvot (cca 1,2 ml) do mikrotitrační destičky, která byla uložena při méně než minus 25°C.

8.1.1.4 Skladování a další manipulace (NAT)

Odebrané vzorky pro NAT byly zamraženy na méně než minus 25°C a při této teplotě skladovány. Den před vlastním testováním byly vzorky umístěny do lednice se sledovanou teplotou 2 až 8°C. Temperování na laboratorní teplotu před testováním probíhalo u všech vzorků minimálně 30 minut.. S archivními vzorky laboratoří FTO VFN (viz 8.1.1.3.) bylo před jejich testováním zacházeno obdobně, po vyjmutí z archivu byly vzorky umístěny do lednice se sledovanou teplotou 2 až 8°C, shodně probíhalo i temperování před vlastním testováním.

8.2 Standardní vyšetřovací metody - popis, postup práce

V rámci standardního režimu vyšetřování infekčních markerů u dárců krve a krevních složek byly použity **kvalitativní** imunoanalytické metody ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo a ARCHITECT Anti-HCV. Dále byla použita **kvantitativní** metoda ARCHITECT HBsAg.

Pro úplnost uvádím, že v rutinním provozu jsou výše uvedené metody doplněny o metodu ARCHITECT Syphilis TP pro kvalitativní detekci protilátek proti *Treponema pallidum*. Protože však vyšetřování dárců krve na známky onemocnění syphilis nebylo součástí studie, není metoda ARCHITECT Syphilis TP v popisu použitých metod uvedena.

8.2.1 Popis použitých metod

Použité metody CMIA (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay) jsou imunoanalytické metody s chemiluminiscenční detekcí, které využívají potenciálu vazby antigenu a protilátky, přičemž jeden z účastníků této vazby je vždy sorbován na pevnou fázi, kterou v tomto případě tvoří povrch paramagnetických částic. Známý antigen a/nebo protilátka, pomocí kterého se stanovuje daná protilátka a/nebo antigen ve vzorku, je zároveň konjugován s akridinovým barvivem pro následnou detekci. Paramagnetické částice umožňují během jednotlivých cyklů reakce snadnější separaci navázaného konjugátu od dalších produktů reakce. Vlastní analýza je pak v závislosti na aplikaci jedno nebo dvoukroková a testovaným vzorkem je plazma.

Po vazbě konjugátu na sledovaný antigen a/nebo protilátku se do reakční směsi přidává nejprve roztok „Pre-Trigger“, který obsahuje 1,32%_(w/v) peroxid vodíku a slouží k odštěpení konjugátu navázaného na mikročásticích, v další fázi pak roztok „Trigger“, který obsahuje 0,35M hydroxid sodný a spouští vlastní chemiluminiscenční reakci.

Chemiluminiscenční reakce se měří v relativních světelných jednotkách (RLU⁶⁰ - Relative Light Units), množství antigenu a/nebo protilátky ve vzorku je přímo úměrné velikosti signálu (RLU). Výsledný naměřený signál je vztažen k hodnotě cut off (CO⁶¹, hodnota je získaná kalibrací) a o reaktivitě nebo negativitě vzorku pak rozhoduje poměr signálu ke cut off (S^{62}/CO). Výjimkou je kvantitativní metoda ARCHITECT HbsAg, u které je výsledný signál (RLU) vyjádřen jako počet mezinárodních jednotek na mililitr (IU/ml).

Všechny výše uvedené metody byly realizovány na systému Architect i2000 firmy Abbott.

Obrázek 5: Systém Abbott Architect i2000 (Abbott)⁶³



⁶⁰ Relative Light Units

⁶¹ Cut off

⁶² Signál v RLU

⁶³ Zdroj: Abbott Laboratories , s.r.o., Diagnostics Division, Czech republic

8.2.1.1 ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo

Vyšetření k průkazu infekce virem HIV 1 a 2 se provádí metodou stanovení protilátek anti-HIV 1 a 2 a antigenu p24 HIV.

Metoda umožňuje souběžné kvalitativní stanovení antigenu HIV p24 a protilátek anti-HIV- 1 a anti-HIV- 2, ale nerozlišuje mezi detekcí antigenu HIV p24 a protilátek anti-HIV-1 nebo anti-HIV-2.

Pro stanovení protilátek je využit klíčový imunogenní protein, transmembránový protein viru HIV (TMP⁶⁴). Protilátky anti-TMP se vždy objevují mezi prvními protilátkami při sérokonverzi u jedinců infikovaných HIV. Protilátková odpověď anti-TMP zůstává relativně silná v celém průběhu onemocnění.

Transmembránové proteiny HIV-1 skupin M a O a HIV-2 jsou v reagenčním kitu metody zastoupeny pěti rekombinantními antigeny a dvěma syntetickými peptidy odvozenými z nativních sekvencí TMP. Důvodem pro zahrnutí tří párů TMP je genetická diverzita v rámci HIV-1 a HIV-2.

Pro detekci známek infekce ještě před sérokonverzí je v metodě zahrnuta i diagnostika antigenu HIV. Reagencie obsahují protilátky anti-HIV p24, které umožňují detekci nejčastěji používaného markeru antigenémie infekce HIV, core proteinu p24.

Uspořádání metody

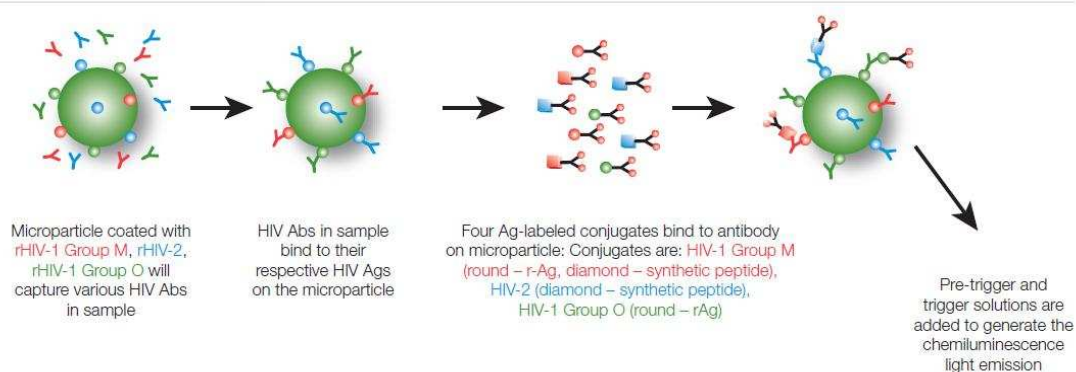
Mikročástice reakčního kitu ve fyziologickém roztoku s Tris pufrém jsou potaženy rekombinantním antigenem HIV-1/HIV-2 a myšími monoklonálními protilátkami anti-HIV p24. Po přidání vzorku, který obsahuje antigen HIV p24 a protilátky anti-HIV-1/anti-HIV-2, dochází k vazbě antigenu a/nebo protilátek přítomných ve vzorku s myšími monoklonálními protilátkami a/nebo rekombinantním antigenem.

⁶⁴ Transmembránový protein HIV

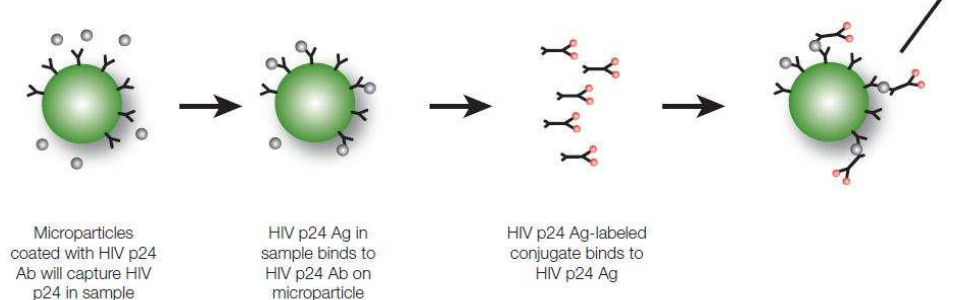
Po promytí fyziologickým roztokem s fosfátovým pufrem a přidání konjugátu s akridiniem (směs rekombinantních antigenů HIV-1 s akridiniem, syntetických peptidů HIV-1/HIV-2 s akridiniem a myších monoklonálních protilátek anti-HIV-p24 s akridiniem) se částice konjugátu naváží na komplex antigen-protilátka vzniklý na paramagnetických částicích. Následuje další promývací cyklus a spouštění výsledné chemiluminiscenční reakce roztoky Pre-Trigger a Trigger.

Obrázek 6: Uspořádání metody ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo (Abbott)⁶⁵

HIV-1/HIV-2 Antibody Detection



HIV p24 Antigen Detection



8.2.1.2 ARCHITECT HBsAg

Vyšetření k průkazu infekce virem hepatitidy B se provádí metodou stanovení povrchového antigenu - HbsAg. Metoda je kvantitativní a stanovení opět probíhá v plazmě.

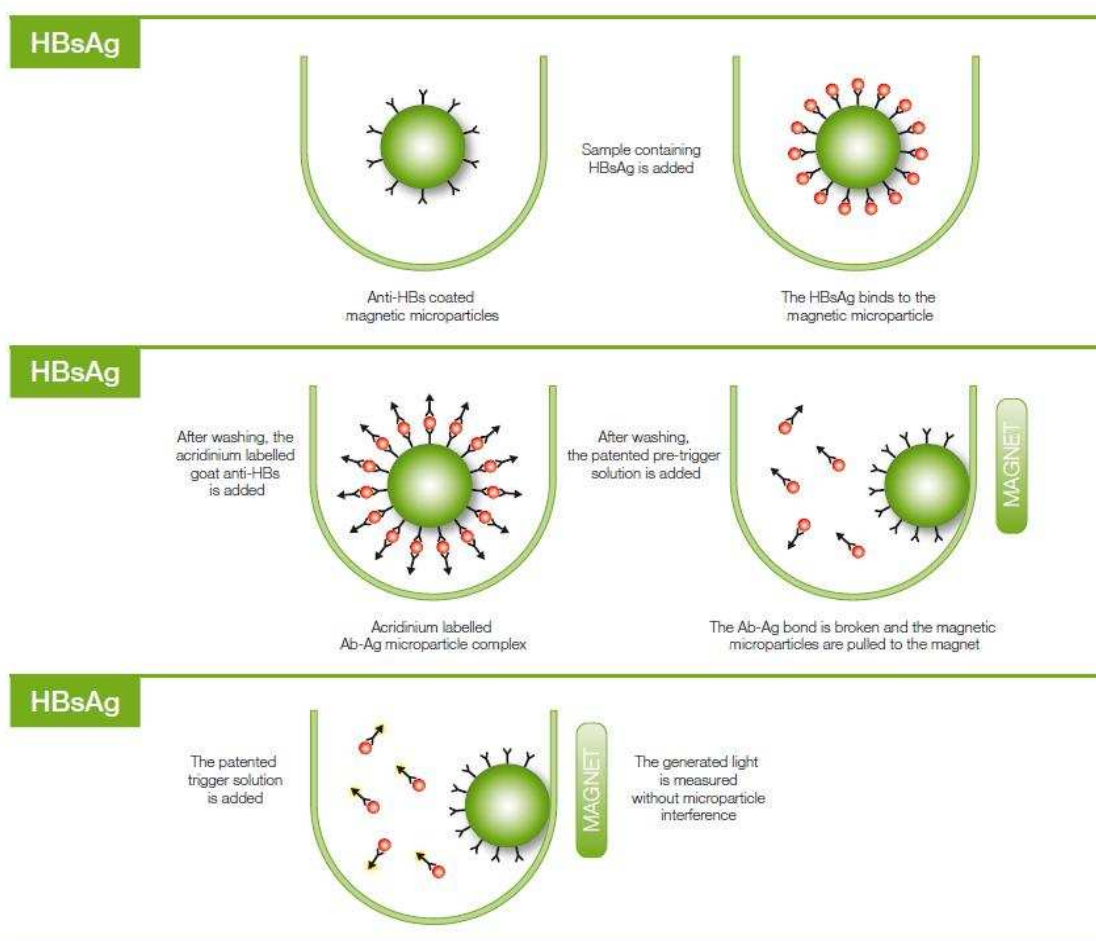
⁶⁵ Zdroj: Abbott Laboratories , s.r.o., Diagnostics Division, Czech republic

Uspořádání metody

Celá analýza je dvoukroková, na počátku testování se vzorek smíchá s paramagnetickými mikročasticemi potaženými protilátkami anti-HBs. HbsAg přítomný ve vzorku se naváže na protilátky na mikročasticích, po promytí se během druhého kroku přidá konjugát anti-HBs – akridin.

Spouštění výsledné chemiluminiscenční reakce probíhá opět po dalším promývacím cyklu s fyziologickým roztokem a fosfátovým pufrém pomocí roztoků Pre-Trigger a Trigger. Koncentrace HbsAg ve vzorku (v IU/ml) se určuje dle předem sestavené kalibrační křivky.

Obrázek 7: Uspořádání metody ARCHITECT HBsAg (Abbott)⁶⁶



⁶⁶ Zdroj: Abbott Laboratories, s.r.o., Diagnostics Division, Czech republic

8.2.1.3 ARCHITECT Anti-HCV

Vyšetření k průkazu infekce virem hepatitidy C se provádí metodou stanovení protilátek anti-HCV. Detekce protilátek proti viru hepatitidy C je kvalitativní a vyšetřovaným vzorkem je lidská plazma.

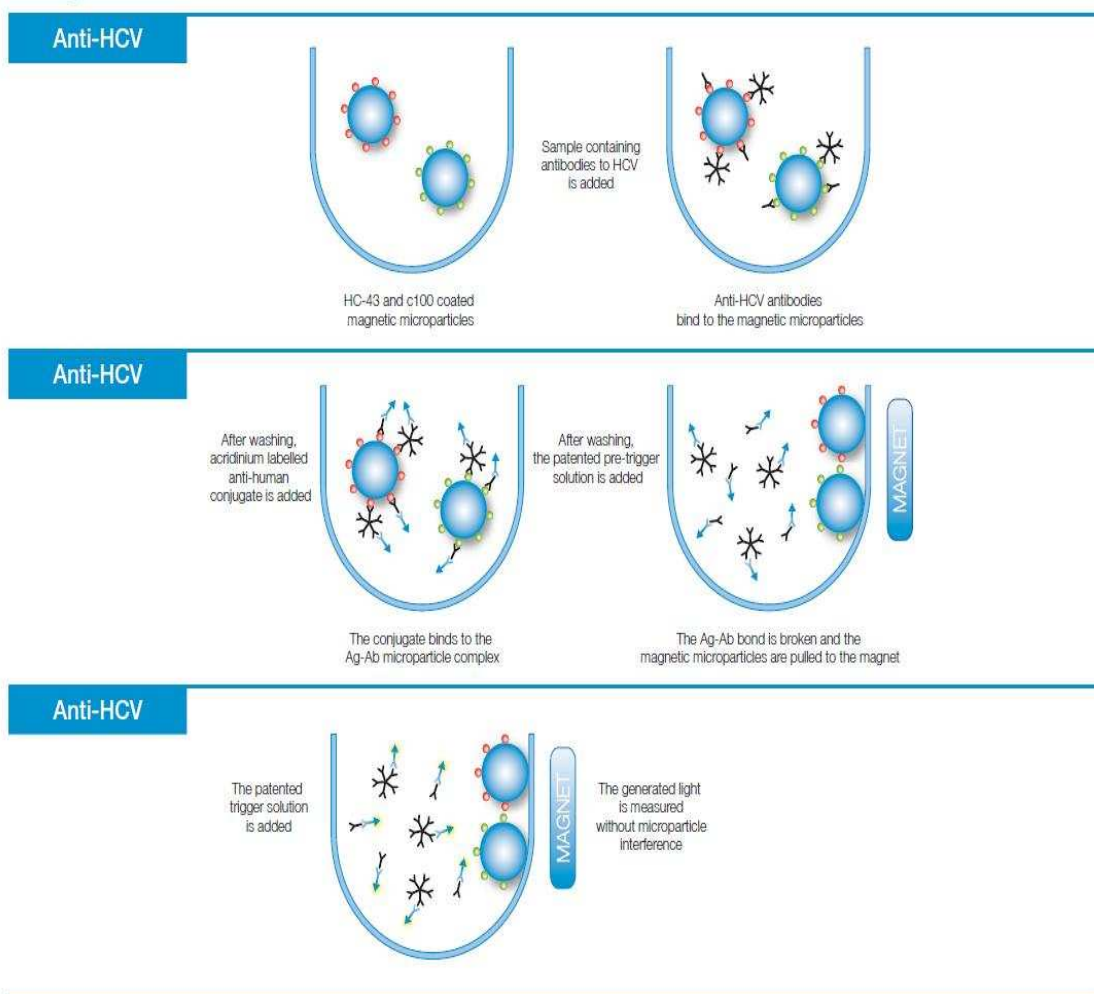
Uspořádání metody

Tato imunoanalýza je dvoukroková. Během prvního kroku se testovaný vzorek přidá k paramagnetickým mikročasticím a k ředícímu roztoku s Tris pufrem.

Mikročástice jsou potaženy rekombinantním antigenem HCV (rekombinantní antigen HCV je prezentován předpokládanými strukturálními a nestrukturálními proteiny z genomu HCV, a to proteinem HCr43 a proteinem c100-3). Protilátky anti-HCV přítomné ve vzorku se naváží na antigen HCV na mikročasticích.

Po promytí se během druhého kroku přidá konjugát anti-humánních protilátek s akridiniem. Po dalším promývacím cyklu, který odstraní z reakční směsi nezreagované částice, se opět pomocí roztoků Pre-Trigger a Trigger spouští výsledná chemiluminiscenční reakce.

Obrázek 8: Uspořádání metody ARCHITECT anti-HCV (Abbott)⁶⁷



8.2.1.4 Řízení kvality při testování imunoanalytickými metodami

Před vlastním testováním vzorků dárců krve na systému Abbott Architekt i2000 se provádí vnitřní kontrola kvality ověřením správnosti použitých metod na základě měření kontrolního materiálu. Vnitřní kontroly na dvou úrovních (pozitivní a negativní) dodávané firmou Abbott pro každou metodu, jsou doplněny nezávislými kontrolami (jiný výrobce), které jsou používány také na dvou úrovních pro všechny markery. Každá vnitřní kontrola má výrobcem garantovaný interval hodnot koncentračního rozmezí. Ověřování metody je doplněno o měření reprodukovatelnosti tj. sledování přesnosti v čase. Data z měření kontrolního materiálu jsou dále analyzována pomocí Levey-Jenningsových grafů.

⁶⁷ Zdroj: Abbott Laboratories , s.r.o., Diagnostics Division, Czech republic

Při změně šarže reagenčního kitu je systém vždy kalibrován a platnost kalibrace ověřena formou testování shody výsledků pro oba reagenční kity (pro původní a novou šarži), dále se provádí měření kontrolního materiálu (viz kalibrace reagenčních kitů).

Kontrolní materiál

- Vnitřní kontrolní materiál

Metoda ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo - kontroly jsou připraveny v rekalifikované lidské plazmě (kromě pozitivní kontroly 3), pozitivní kontroly mají tři koncentrační hladiny.

Negativní kontrola je nereaktivní na HBsAg, HIV-1 Ag nebo HIV-1 NAT, anti-HCV, anti-HIV-1/HIV-2 a anti-HBs.

Pozitivní kontrola 1 (inaktivovaná) je reaktivní na anti-HIV-1 a nereaktivní na HBsAg, HIV-1 Ag nebo HIV-1 NAT a anti-HCV.

Pozitivní kontrola 2 (inaktivovaná) je reaktivní na anti-HIV-2 a nereaktivní na HBsAg, HIV-1 Ag nebo HIV-1 NAT a anti-HCV.

Pozitivní kontrola 3 je purifikovaný virový lyzát HIV připravený ve fyziologickém roztoku s TRIS pufrům a bovinním bílkovinným stabilizátorem.

Metoda ARCHITECT HbsAg

Negativní kontrola je připravena v rekalifikované lidské plazmě; nereaktivní na HBsAg, HIV RNA nebo HIV-1 Ag, anti-HIV-1/HIV-2, anti-HCV a anti-HBs.

Pozitivní kontrola obsahuje inaktivovaný purifikovaný HBsAg (lidského původu) (subtypy *ad/ay*) ve fosfátovém pufru s bílkovinnými stabilizátory (bovinní a lidská plazma; reaktivní na HBsAg a nereaktivní na HIV RNA nebo HIV-1 Ag, anti-HIV-1/HIV-2, anti-HCV a anti-HBs).

Metoda ARCHITECT Anti-HCV - kontroly jsou připravené v rekalifikované a inaktivované lidské plazmě.

Negativní kontrola je nereaktivní na HBsAg, HIV-1 Ag, anti-HCV a anti-HIV-1/HIV-2. *Pozitivní kontrola* je reaktivní na anti-HCV a nereaktivní na HBsAg, HIV-1 Ag a anti-HIV-1/HIV-2.

- Nezávislý kontrolní materiál

Jako nezávislý kontrolní materiál pro vnitřní kontrolu kvality byla používána multimarkerová pozitivní a negativní kontrola Accurun (firma Ascomed). Použité kontrolní materiály nemají určenou hladinu reaktivity, tato hodnota se liší i mezi jednotlivými šaržemi, nastavení koncentračního rozmezí probíhá standardně na základě měření opakovatelnosti pro každou novou šarži.

ACCURUN 1 Serie 2 600

Kontrola je vyrobena z lidské plazmy a je reaktivní na antigen HBsAg a protilátky anti-HIV-1, anti-HIV-2, anti-HTLV I, anti-HTLV II, anti-HBcAg, anti-HCV a anti-CMV.

ACCURUN 810

Kontrola je vyrobena z lidského séra nebo plazmy a je nereaktivní na antigeny HbsAg, HbeAg a protilátky anti-HBs, anti-HBc, anti-HBc IgM, anti-HBe, anti-HCV, anti-HAV, anti-HAV IgM, anti-CMV, Syphilis RPR, protilátky proti HIV 1 a 2, HTLV I a II Lyme IgG a Lyme IgM, Syphilis ATA.

Kalibrace reagenčních kitů

Při každé změně šarže reagenčního kitu se provádí kalibrace systému. Kalibrace pro metody ARCHITECT Anti-HCV a ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo je jednobodová, pro metodu ARCHITECT HBsAg pak dvoubodová. Měření kalibrátoru pro metodu probíhá vždy třikrát, následně je vypočtena průměrná hodnota tohoto měření, která po korekci číselným faktorem představuje výslednou hranici cut off (CO) pro danou šarži reagenčního kitu.

Kalibraci systému doplňuje ověření shody pro metodu. Při ověřování shody je vybraný vzorek dárce 10x měřen v sérii a to jak na původní, tak na nové šarži reagenčního kitu. Výsledky musí vykazovat shodu.

Následuje ověření pomocí měření vnitřní kontroly kvality (vnitřní i nezávislé kontroly, pozitivní i negativní) a na závěr kalibrace je v sérii 5x měřena nezávislá pozitivní kontrola, stanovené maximum pro CV% ⁶⁸ tohoto měření je 20.

8.2.1.5 Výsledky a jejich interpretace

Všechny počátečně reaktivní vzorky jsou vyšetřeny opakovaně v duplikátu. Jsou-li hodnoty při obou opakováních nereaktivní, je vzorek považován za nereaktivní. Pokud je jeden z výsledků opakovaných měření reaktivní, je vzorek považován za opakovaně reaktivní a dále vyšetřen konfirmačními testy v Národní referenční laboratoři pro virové hepatitidy nebo v Národní referenční laboratoři pro AIDS. Reaktivita a negativita je stanovena na základě hodnoty S/CO vzorku, mezi oběma výslednými možnostmi je nastavena šedá zóna. Pokud je S/CO vzorku v šedé zóně, postupuje se shodně jako v případě počáteční reaktivity. Přehled interpretace výsledků pro systém Abbott Architect i2000 je v tabulce č.10.

Tabulka 10: Přehled interpretace výsledků pro systém Abbott Architect i2000⁶⁹

Metoda	Jednotky	Nereaktivní (non reaktive)	Šedá zóna (gray zone)	Reaktivní (reaktive)	Vysoce reaktivní (high reaktive)
HIV Ag/Ab Combo	(S/CO)	pod 0,9	0,9 – 1,0	nad 1,0	-
HBsAg	(IU/ml)	pod 0,045	0,045 – 0,050	0,050 – 250,0	nad 250,0
Anti-HCV	(S/CO)	pod 0,9	0,9 – 1,0	1,0 – 99,0	nad 99,0

8.2.1.6 Senzitivita a specifita použitých metod

Senzitivita (citlivost záchytu pozitivních) a specifita (procento správně zachycených negativních) je pro každou metodu stanovena na základě testování reprezentativního počtu vzorků od jedinců s klinicky diagnostikovanou infekcí resp. vzorků dárců s nulovou prevalencí dané infekce výrobcem testu (viz tabulka č.11).

⁶⁸ Variační koeficient (v procentech)

⁶⁹ Zdroj: vlastní zpracování

Tabulka 11: Senzitivita a specifita použitých metod (Abbott CMIA)⁷⁰

Metoda	Senzitivita [%]	Interval spolehlivosti [%]	Specifita [%]	Interval spolehlivosti [%]
HIV Ag/Ab Combo	100	-	99,89	99,68 - 99,98
HBsAg	99,52	95	99,87	95
Anti-HCV	99,10	95	99,6	95

8.2.1.7 Diagnostická okna (window periods) pro jednotlivé metody

Diagnostické okno (window perioda) je časový úsek od infikování jedince do doby, kdy je možno infekci diagnostikovat. V následující tabulce (tab. č. 12) jsou uvedena diagnostická okna u metody CMIA, kterou byli vyšetřováni dárči krve v rámci této studie na systému Architect i2000 a kterou jsou vyšetřováni v rámci rutinního provozu ve FTO VFN v Praze.

Tabulka 12: Window perioda (diagnostické okno) u sledovaných infekcí při použití imunoanalytických metod (Abbott CMIA)⁷¹

Metoda	Diagnostické okno
HIV Ag/Ab Combo	17 dní
HBsAg	6 týdnů
anti-HCV	50 dní a více

8.2.2 Vyšetřování imunoanalytickými metodami – postup práce

Systém Abbott Architect i2000 je automatický analyzátor. Vlastní testování je zahájeno po přípravě vzorků (viz preanalytická fáze), kdy jsou testované vzorky přeneseny do laboratoře infekčních markerů a ve stojácích pro systém Abbott Architect i2000 umístěny do analyzátoru.

Pro úplnost popisu procesu vlastního testování uvádím, že vždy před zahájením analýzy je provedena údržba systému, jejíž součástí je doplnění provozních roztoků a kontrola a ev. doplnění reakčních kitů.

⁷⁰ Zdroj: vlastní zpracování

⁷¹ Zdroj: Abbott Laboratories , s.r.o., Diagnostics Division, Czech republic

Následuje měření kontrolního materiálu (viz kapitola 8.2.1.4 Řízení kvality při testování imunoanalytickými metodami). Splňují-li výsledky měření kontrolního materiálu stanovená kritéria, je přistoupeno k vyšetřování vlastních vzorků.

Přenos výsledků do informačního systému FTO VFN po ukončení analýzy probíhá automaticky.

8.3 Testování molekulárně-biologickými metodami (NAT) - popis, postup práce

Výše popsané standardní imunoanalytické testování dárců krve a krevních složek ve FTO VFN bylo doplněno o testování molekulárně biologickými metodami, tedy o testování přítomnosti virových nukleových kyselin pomocí aplikace multiplexní polymerázové řetězové reakce s použitím reverzní transkripce a fluorescenční detekcí v reálném čase v testu cobas TaqScreen MPX na systému cobas s201.

Vlastní testování shromážděných vzorků (viz preanalytická fáze) probíhalo na systému cobas s201 nezávisle na rutinním provozu v laboratořích FTO VFN na přelomu roku 2008 a 2009, (přesněji mezi 21.10.2008 a 3.2.2009). Zpracování naměřených dat a z něj plynoucí další testování na jiných analytických systémech v Ústavu klinické a laboratorní diagnostiky VFN a v Národní referenční laboratoři pro virové hepatitidy pak probíhalo až do dubna roku 2010.

8.3.1 Popis použité metody

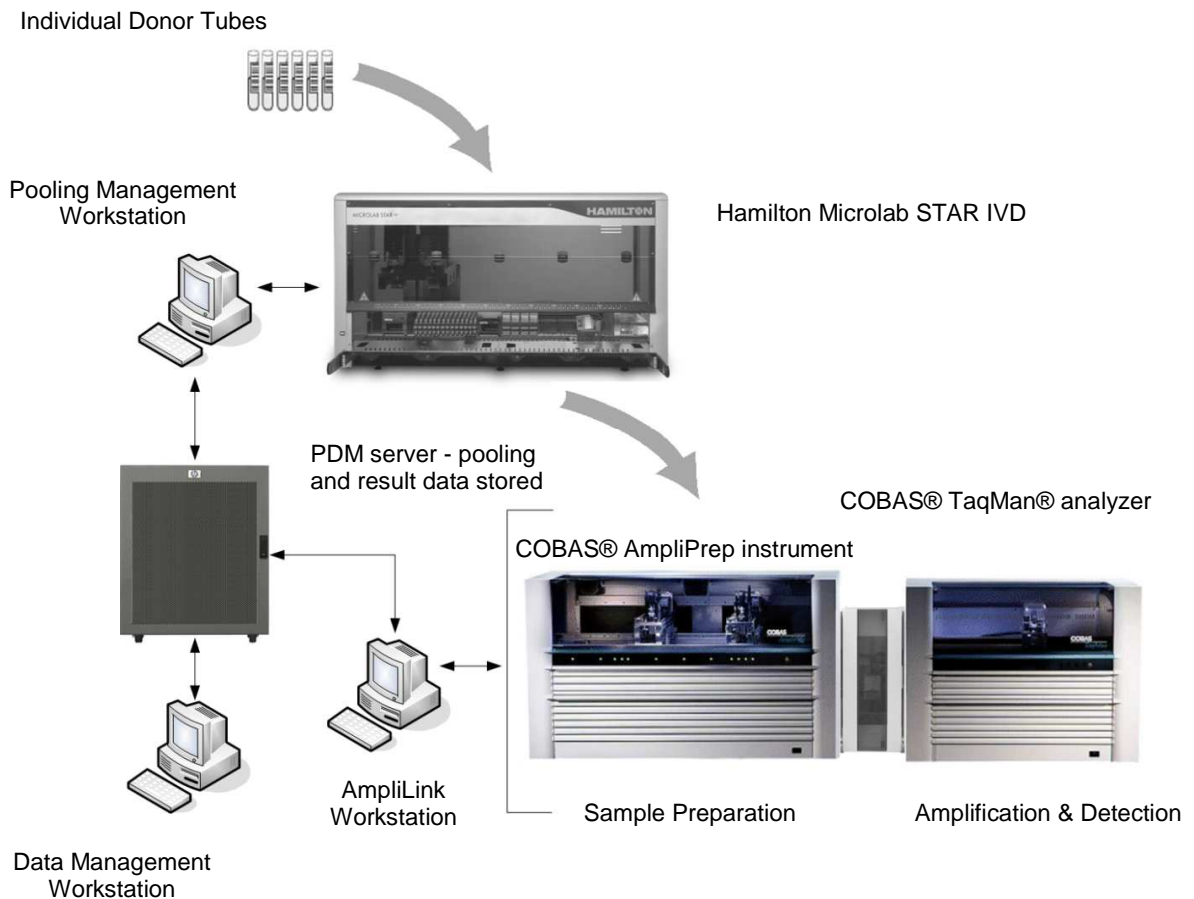
Test cobas TaqScreen MPX je kvalitativní in vitro test určený ke screeningovému testování dárců krve pro zjištění HIV-1 RNA skupiny M, HIV-1 RNA skupiny O, HIV-2 RNA, HCV RNA a HBV DNA bez rozlišení konkrétního viru při detekci. Testování vzorků plazmy lze provádět ve směsných vzorcích (tedy v poolu) nebo se testují jednotlivé vzorky. V rámci studie ve FTO VFN bylo testování při standardním provozu prováděno v poolu ze šesti vzorků, v případě potřeby byly vyšetřovány vzorky i jednotlivě.

Vlastní analýza vzorků na systému cobas s201 probíhá v několika krocích – viz obr. č. 9.

Analýza probíhala v následujících krocích:

- automatická tvorba směsí vzorků a kontrolované pipetování pomocí pipetoru Hamilton Microlab Star
- příprava a izolace nukleové kyseliny ze vzorku v zařízení cobas AmpliPrep
- amplifikace nukleové kyseliny a detekce produktů polymerázové řetězové reakce v reálném čase pomocí fluorescence na analyzátoru cobas TaqMan
- řízení a zpracování dat pomocí softwaru PDM (PDM server)

Obrázek 9: Systém cobas s201⁷²



⁷² Zdroj: Roche s.r.o., Molecular Diagnostics, Czech republic

8.3.1.1 Automatická tvorba směsí vzorků a kontrolované pipetování pomocí pipetoru Hamilton Microlab Star

Prvním krokem analýzy je pipetování vzorků a kontrolního materiálu pro cobas AmpliPrep. Připravené vzorky (viz preanalytická fáze) resp. alikvotní podíly těchto vzorků, jsou pipetovány do vstupních zkumavek (S zkumavky). Ke každé sérii vzorků je pipetován kontrolní materiál - jedna negativní kontrola a pět pozitivních kontrol (viz dále).

Základní sérii (dávku) vzorků s kontrolami tvoří pool ze šesti vzorků (v S-zkumavkách). Ovládání pipetování probíhá v pooling management softwaru (Roche PDM Pooling Wizard). Po dokončeném pipetování jsou S-zkumavky manuálně uzavřeny víčky a po vytvoření protokolu v softwaru AmpliLink (viz dále) přeneseny do zařízení cobas AmpliPrep. Pooly a kontroly jsou stabilní v S-zkumavkách po dobu 6 hodin při 30°C, tzn., že maximální doba mezi uzavřením resp. dokončením pipetování a začátkem extrakce nukleových kyselin vzorků v cobas AmpliPrep je 6 hodin. Takto připravená série vzorků je vždy společně v cobas AmpliPrep zpracována tj. probíhá pipetování vzorku, extrakce, amplifikace a detekce nukleových kyselin.

Dárcovské zkumavky, S-zkumavky a kontroly jsou opatřeny čárovými kódy, při zjištění reaktivity poolu se další rozpipetování za účelem zjištění konkrétního reaktivního vzorku provádí opět pomocí protokolu v Roche PDM Pooling Wizard.

Pro úplnost uvádím, že jak vzorky dárců krve a krevních složek, tak kontrolní materiál byly vždy po vyjmutí z lednice (před zahájením vlastního testování) temperovány na teplotu v laboratoři po dobu minimálně 30 minut. Před prvním pipetováním byla prováděna údržba pipetoru Hamilton Microlab Star.

Obrázek 10: Automatický pipetor Hamilton Microlab Star⁷³



8.3.1.2 Příprava a izolace nukleové kyseliny ze vzorku na cobas AmpliPrep

Druhá část analýzy probíhá na zařízení cobas AmpliPrep, samotný proces je řízen pomocí softwaru AmpliLink na jedné z pracovních stanic. Každá souprava testu TaqScreen MPX obsahuje osm kazet - dvě kazety MPX CS1 s magnetickými skleněnými částicemi, dvě kazety MPX CS2 s činidlem pro lýzu, dvě kazety MPX CS3 s proteázou a elučním pufrům a dvě kazety MPX CS4 s vnitřní kontrolou (IC) a tzv. mastermix činidly (MMX 1 a 2) pro následnou amplifikaci a detekci, které se přidávají ke vzorku po izolaci nukleových kyselin. Tyto kazety, vzorky a spotřební materiál jsou do cobas AmpliPrep zaváděny před spuštěním vlastní izolace a purifikace (po provedení předepsané údržby systému).

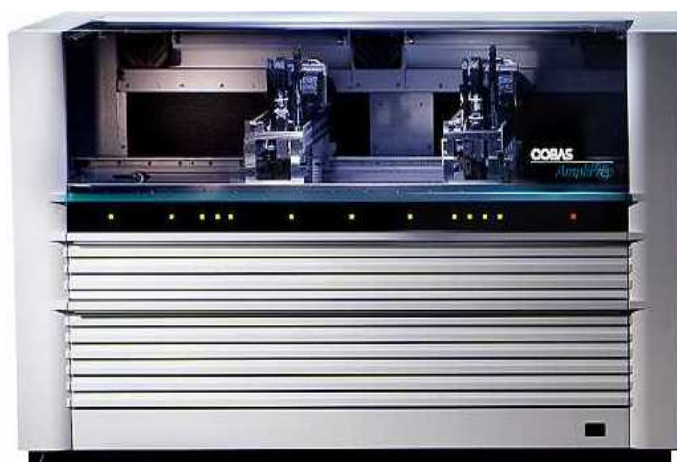
Poznámky k přípravě virových nukleových kyselin

- nukleové kyseliny cílových virů a přidaná vnitřní kontrola Armored RNA (IC) jsou zpracovávány současně. Vnitřní kontrola Armored RNA je procesní kontrola přípravy vzorku a kontrola amplifikace/detekce,
- roztok proteázy rozpouští proteiny vzorku k podnícení štěpení, deaktivuje nukleázy a usnadňuje uvolnění RNA a DNA z virových částic,
- po přidání činidla pro lýzu ke vzorku nastává štěpení virů a aktivace nukleázy díky denaturaci proteinů. Dochází k uvolňování RNA a DNA. Aktivita proteázy chrání před nukleázami,

⁷³ Zdroj: Roche s.r.o., Molecular Diagnostics, Czech republic

- dochází k vazbě uvolněných nukleových kyselin (záporný náboj) na rosolový povrch přidávaných magnetických skleněných částic (kladný náboj) za přítomnosti chaotropních solí, které podporují adhezi,
- přidáním promývacího činidla jsou odstraněny nenavázané látky a nečistoty (denaturované proteiny, buněčný odpad a potenciální PCR inhibitory, např. hemoglobin),
- vyčištěné nukleové kyseliny se uvolní z magnetických skleněných částic při zvýšené teplotě elučním pufrem,
- po izolaci vyčištěných nukleových kyselin se přidává Master Mix (MMX 1 a 2) pro amplifikaci a detekci HIV-1 (skupin M a O), HIV-2 a HCV RNA, HBV DNA a IC RNA. Po aktivaci umožňuje Master mix reverzní transkripci pro cílové RNA přidáním octanu manganatého. Vzorky jsou poté transportovány do analyzátoru cobas TaqMan.

Obrázek 11: Zařízení pro izolaci a purifikaci nukleové kyseliny vzorku cobas AmpliPrep⁷⁴



⁷⁴ Zdroj: Roche, s.r.o., Molecular Diagnostics, Czech republic

8.3.1.3 Reverzní transkripce, PCR amplifikace a detekce produktů PCR na cobas TaqMan

Třetí částí analýzy je reverzní transkripce a PCR amplifikace nukleových kyselin vzorku. Reverzní transkripce a následná amplifikace se provádí pomocí termostabilního rekombinantního enzymu, Z05 DNA Polymerázy. Oblasti HIV-1 (skupiny M a O), HIV-2, HCV RNA, HBV DNA a IC RNA (vnitřní kontrola) jsou amplifikovány pomocí specifických primerů, selektivní amplifikace cílové nukleové kyseliny je zajištěna použitím enzymů AmpErase (uracil-N-glykosyláza) a deoxyuridin-trifosfát (dUTP). Enzym AmpErase rozpozná a katalyzuje rozklad řetězců DNA obsahujících deoxyuridin, ale naopak nerozpoznává DNA obsahující deoxythymidin nebo RNA obsahující ribouridin, které se vyskytují pouze v amplikonu.

Amplifikace, hybridizace a detekce probíhají současně. Test obsahuje detekční sondy, které jsou specifické pro cílové virové nukleové kyseliny a pro vnitřní kontrolu (IC) a které jsou označeny jedním nebo dvěma oznamovacími fluorescenčními barvivy a dalším, tlumícím barvivem.

Jedno specifické oznamovací barvivo je spojeno se specifickými virovými sondami a je měřeno při stanovené vlnové délce. Druhé odlišné oznamovací barvivo je spojeno se specifickou sondou vnitřní kontroly (IC) a je měřeno při odlišné vlnové délce.

Ve všech sondách se používá jeden typ tlumícího barviva. To umožňuje odlišit detekci cílových amplifikovaných virů a současnou detekci amplifikované IC změnou vlnové délky.

Před začátkem PCR amplifikace jsou sondy intaktní a oznamovací fluorescenční barvivo je potlačeno tlumícím barvivem. Během PCR amplifikace sonda hybridizuje na specifické jednořetězcové DNA a ve stejném čase, ve kterém nastává amplifikace, jsou jednořetězcové DNA rozštěpeny 5' a 3' nukleázovou aktivitou Z05 polymerázy. Jakmile jsou oznamovací a tlumící barviva tímto štěpením oddělena, dojde k odmaskování fluorescenční aktivity oznamovacího barviva. U každého PCR cyklu jsou generována zvýšená množství rozštěpených sond a kumulativní signál oznamovacího barviva se postupně zvyšuje.

Detekce PCR produktů v reálném čase je pak prováděna měřením fluorescence uvolněných oznamovacích barviv, které představují virové cíle všech sledovaných nukleových kyselin virů (multiplex) a nezávislé IC.

Test cobas TaqScreen MPX nerozlišuje, který virus byl ve vzorku zjištěn.

Poznámky k vlastnímu testování

- připravené vzorky nukleových kyselin byly od zahájení testování po dobu cca 2 měsíců přenášeny z cobas AmpliPrep do analyzátoru cobas TaqMan manuálně, poté byla mezi oba analyzátory nainstalována dokovací stanice,
- amplifikace je zahájena automaticky po umístění stojánku se vzorky do analyzátoru cobas TaqMan, kam musí být vzorky přeneseny nejpozději do jedné hodiny od ukončení izolace a purifikace nukleových kyselin v cobas AmpliPrep. Pokud není dodržen časový interval, amplifikace proběhne, ale je označena jako neplatná (s výjimkou reaktivních vzorků / poolů),
- výsledky amplifikace a detekce je nutné potvrdit (akceptovat) do 10 dnů v softwaru AmpliLink a převést tak do PDM softwaru.

Obrázek 12: Amplifikace a detekce nukleové kyseliny – analyzátor cobas TaqMan⁷⁵



⁷⁵ Zdroj: Roche, s.r.o., Molecular Diagnostics, Czech republic

8.3.1.4 Zpracování dat

Řízení, ukládání a zpracování všech získaných dat probíhá po potvrzení výsledů na stanici AmpliLink v PDM softwaru (data management workstation). Software systému označuje výsledky testů všech analýz jako nereaktivní, reaktivní nebo neplatné. Série vzorků, jejichž hodnocení není dokončeno, jsou označeny jako „Review Batches“ tj. např. při reaktivitě poolu, kdy systém požaduje další pipetování a analýzu po jednotlivých vzorcích nebo při nedokončené analýze (detekována sraženina apod.), kdy je vyžadováno opakování, tedy nové pipetování stejných vzorků. Tyto dávky jsou označeny výstrahou „Alarms Review“, výsledky kontrolního materiálu jsou k dispozici ve složce „Controls Review“ a konečné výsledky pro jednotlivé dárce/vzorky ve složce „Donor Reviews“.

Takto zpracovaná data lze tisknout, prohlížet, ukládat a také manuálně posílat do laboratorního informačního systému.

8.3.1.5 Řízení kvality při užití testu cobas TaqScreen MPX

Před vlastním testováním vzorků dárců krve na systému cobas s201 je prováděna, stejně jako při testování imunoanalytickými metodami, vnitřní kontrola kvality ověřením správnosti použitých metod na základě měření kontrolního materiálu.

Vnitřní kontroly na dvou úrovních (pozitivní a negativní) jsou dodávány firmou Roche a jejich měření probíhá s každou sérií vzorků (stojánek s S-zkumavkami), dále je s každým vzorkem měřena i vnitřní (IC) kontrola amplifikace, systém není doplněn nezávislými kontrolami. Kalibrace při změně šarže kontrolního materiálu nebo reagenčních kitů není třeba na systému cobas s201 provádět.

U každé dávky je tedy provedena jedna replikace negativní kontroly /TS (-)/ a jedna replikace každé z pěti pozitivních kontrol /HIV-1 M (+) C/, /HIV-1 O(+) C/, /HIV-2 (+) C/, /HCV(+) C/, /HBV (+) C/.

Kontrolní materiál

Vnitřní kontrola MPX /MPX IC/

Obsahuje Poly rA syntetickou RNA zapouzdřenou v bílkovině s bakteriofágním obsahem MS2, je negativní na sledované markery, neinfekční.

Pozitivní kontrola HIV-1 M /HIV-1 M (+) C/

Obsahuje syntetickou HIV-1 RNA skupiny M zapouzdřenou v bílkovině s bakteriofágním obalem MS2 a lidskou plazmu nereaktivní na protilátky anti-HCV, protilátky anti-HIV-1/2, HBsAg; HIV-1 RNA, HIV-2 RNA, HCV RNA a HBV DNA nedetekovatelné PCR metodami, je neinfekční.

Pozitivní kontrola HIV-1 O /HIV-1 O(+) C/

Obsahuje syntetickou HIV-1 RNA skupiny O zapouzdřenou v bílkovině s bakteriofágním obalem MS2 a lidskou plazmu nereaktivní na protilátky anti-HCV, protilátky anti-HIV-1/2, HBsAg; HIV-1 RNA, HIV-2 RNA, HCV RNA a HBV DNA nedetekovatelné PCR metodami, je neinfekční.

Pozitivní kontrola HIV-2 /HIV-2 (+) C/

Obsahuje syntetickou HIV-2 RNA zapouzdřenou v bílkovině s bakteriofágním obalem MS2 a lidskou plazmu nereaktivní na protilátky anti-HCV, protilátky anti-HIV-1/2, HBsAg; HIV-1 RNA, HIV-2 RNA, HCV RNA a HBV DNA nedetekovatelné PCR metodami, je neinfekční.

Pozitivní kontrola HCV /HCV(+) C/

Obsahuje syntetickou HCV RNA zapouzdřenou v bílkovině s bakteriofágním obalem MS2 a lidskou plazmu nereaktivní na protilátky anti-HCV, protilátky anti-HIV-1/2, HBsAg; HIV-1 RNA, HIV-2 RNA, HCV RNA a HBV DNA nedetekovatelné PCR metodami, je neinfekční.

Pozitivní kontrola HBV /HBV (+) C/

Osahuje syntetickou HBV DNA zapouzdřenou v bílkovině s bakteriofágním obalem Lambda a lidskou plazmu nereaktivní na protilátky anti-HCV, protilátky anti-HIV-1/2, HBsAg; HIV-1 RNA, HIV-2 RNA, HCV RNA a HBV DNA nedetekovatelné PCR metodami, je neinfekční.

Negativní kontrola cobas TaqScreen /TS (-)/

Obsahuje lidskou plazmu nereaktivní podle licenčních testů na protilátky anti-HCV, protilátky anti-HIV-1/2, HBsAg; HIV-1 RNA, HIV-2 RNA, HCV RNA a HBV DNA nedetekovatelné PCR metodami.

8.3.1.6 Výsledky a interpretace výsledků

Pro platnost výsledků analýzy musí být platné výsledky kontrolního materiálu tj. výsledek testování negativní kontroly /TS (-)/ je označen jako nereaktivní a výsledek každé z pěti pozitivních kontrol - /HIV-1 M (+) C/, /HIV-1 O(+) C/, /HIV-2 (+) C/, /HCV(+) C/, /HBV (+) C/ - jako reaktivní.

Zároveň musí být platná vnitřní asociovaná (IC) kontrola, která je součástí všech pozitivních kontrol i negativní kontroly. V opačném případě je celá dávka neplatná. Dále musí být u každého testovaného vzorku dárce také platná tato asociovaná vnitřní kontrola (IC) bez ohledu na výsledek testování, v opačném případě je opět výsledek vyšetření označen jako neplatný a stanovení je opakováno.

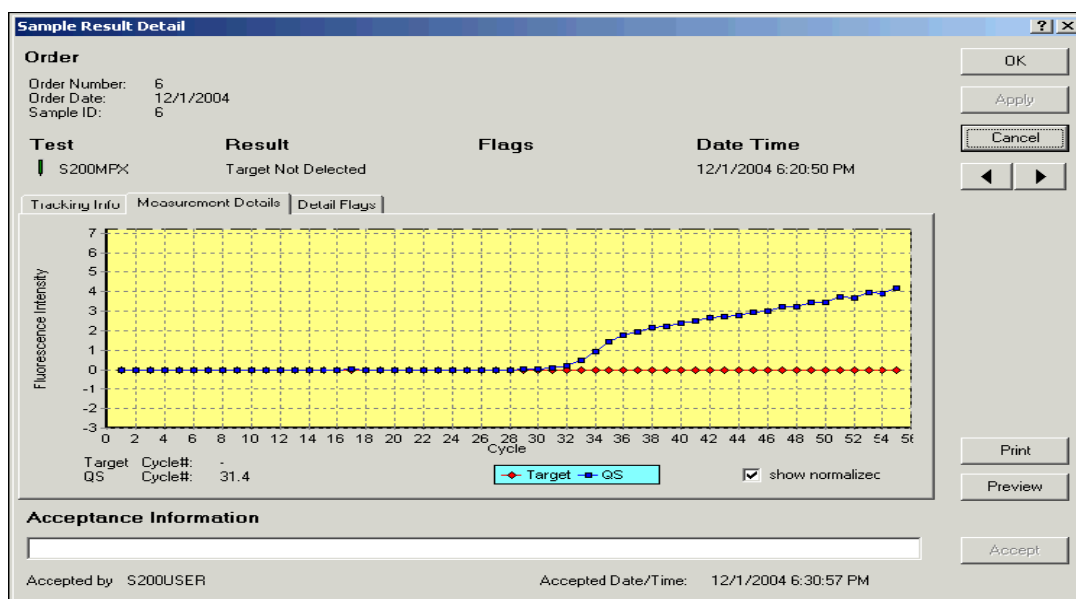
Konečné výsledky testu cobas TaqScreen MPX jsou vykazovány pomocí PDM softwaru následovně: viz tabulka č.13.

Tabulka 13: Interpretace výsledků z PDM softwaru⁷⁶

Stav vzorku (výsledek)	Význam
Complete Non-Reactive	Dárce je nereaktivní u testovaného analytu/ů
Complete Reactive	Dárce je reaktivní u testovaného analytu/ů
Complete Unresolved	Doba životnosti vzorku dárce vypršela před přidělením stavu reaktivní nebo nereaktivní. U tohoto vzorku dárce nelze na systému provést dodatečné testování
Invalid	Analýza není validní
Repeat Needed	Testování vzorků je třeba opakovat
Resolution needed	Směs s více vzorky je reaktivní, je třeba provést nové pipetování a analýzu jednotlivých vzorků samostatně

Zjištění reaktivity vzorku probíhá bez dalšího rozlišení konkrétního viru a je kvalitativní. Se vzorky, které byly na systému cobas s201 označeny jako reaktivní, bylo tedy zacházeno jako s reaktivními vzorky při použití standardních imunoanalytických metod tj. pro další rozlišení byly posílány do Národní referenční laboratoře pro virové hepatitidy a/nebo do Národní referenční laboratoře pro AIDS.

Obrázek 13: Detail výsledku analýzy vzorku (Complete Non reactive)⁷⁷



⁷⁶ Zdroj: vlastní zpracování dle materiálů Roche, s.r.o., Molecular Diagnostics, Czech republic

⁷⁷ Zdroj: Roche, s.r.o., Molecular Diagnostics, Czech republic

Na obrázku č.13 je příklad detailu výsledku vyšetření vzorku, kde červená křivka představuje výslednou fluorescenční aktivitu (signál) vzorku, modrá křivka naopak signál asociované vnitřní kontroly.

8.3.1.7 Senzitivita testu cobas TaqScreen MPX

Detekce HIV-1 RNA skupiny M, HIV-1 RNA skupiny O, HIV-2 RNA, HCV RNA a HBV DNA je závislá na počtu virových částic přítomných ve vzorku, důležitým činitelem kvality detekce v molekulárně diagnostických metodách jako je TaqScreen MPX test je preanalytická fáze a další faktory jako je např. věk dárce krve a krevních složek a v neposlední řadě hraje nezanedbatelnou roli i riziko kontaminace vyšetřovaného materiálu během pipetování a manipulace se stojánky před vložením do zařízení cobas AmpliPrep.

Je třeba zmínit i skutečnost, že ve vzácných případech, kdy je ve vysoce chráněných oblastech genomu viru mutace, nemusí být virus testem cobas® TaqScreen MPX detekován.

Tabulka 14: Průměrná klinická specifita testu cobas TaqScreen MPX⁷⁸

Typ vzorku	Průměrná klinická specifita [%]	Interval spolehlivosti [%]
Plná krev	99,98	95
Plazma	100	95

Průměrná klinická specifita testu (viz tabulka č.14) pro vzorky plné krve byla hodnocena testováním samostatných i směsných vzorků, průměrná klinická specifita testů pro vzorky plazmy byla stanovena testováním směsných vzorků.

Analytická senzitivita – mezinárodní normy WHO / Normy Roche

Detekční hranice testu cobas TaqScreen MPX pro HIV-1 skupiny M, HIV-1 skupiny O, HIV-2, HCV a HBV byly stanoveny pomocí následujících standardů:

⁷⁸ Zdroj: Roche, s.r.o., Molecular Diagnostics, Czech republic

- mezinárodní standard WHO pro HBV (kód NIBSC 97/746),
- mezinárodní standard WHO pro HCV RNA (kód NIBSC 96/798),
- standard společnosti Roche pro HIV-1 skupiny M (komerčně dostupný, kultivovaný virový kmen HIV-1 LAV 8E5, PN 227, Boston Biomedica, Inc zjistitelný dle prvního mezinárodního standardu WHO pro HIV-1 RNA-kód NIBSC97/656),
- standard společnosti Roche pro HIV-1 skupiny O a HIV-2 (komerčně dostupné, kultivované virové kmeny, PN 242O, Boston Biomedica, Inc. a kat. č. 10-127-000 od firmy Advanced Biotechnologies, Inc., mezinárodní standardy pro tyto viry neexistují.

Analytická senzitivita byla stanovena na základě analýzy tří ředění každého standardu s normální, virově negativní lidskou plazmou a každá řada ředění byla testována pomocí tří různých šarží testu cobas TaqScreen MPX.

Pro stanovení detekčních hranic na 95% hladině významnosti a průměrné detekční hranice byla použita analýza pomocí PROBIT u kombinovaných dat ze všech testovaných replikátů každého viru. Výsledné hodnoty analytické senzitivity jsou uvedeny v tabulce č.15.

Tabulka 15: Analytická senzitivita testu cobas TaqScreen MPX⁷⁹

Analyt	Jednotky	Standard	Průměrná 95% detekční hranice (LOD)	Dolní mez 95%	Horní mez 95 %
HIV-1, skupina M	IU/ml	Sekundární standard společnosti Roche	49	42,4	58,1
HIV-1, skupina O	Kopii/ml	Primární standard společnosti Roche	89	56	217
HIV-2	Kopii/ml	Primární standard společnosti Roche	59	51,9	69,7
HCV	IU/ml	Druhý mezinárodní standard WHO	11	7,0	21,7
HBV	IU/ml	Mezinárodní standard WHO	3,8	3,3	4,4

⁷⁹ Zdroj: Roche, s.r.o., Molecular Diagnostics, Czech republic

Analytická specifita – potenciálně křížově reaktivní a interferující mikroorganismy

Testování analytické specifiky testu bylo prováděno pomocí 17-ti potenciálně interferujících mikroorganismů, včetně 12-ti virových izolátů, 4 bakteriálních kmenů a 1 kvasinkového izolátu, byly testovány: Adenovirus 2, Cytomegalovirus, Virus Epstein-Barrové, Varicella zoster virus, Herpes simplex virus, typ 1 a 2, Lidský herpes virus 6, Lidský T-lymfotropní virus, typ I a II, Virus hepatitidy A, Virus chřipky G (GBV-C), Staphylococcus aureus, Candida albicans, Propionibacterium acnes, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus haemolyticus.

Mikroorganismy byly přidány do normální virově negativní lidské plazmy a testovány s a bez HIV-1 skupiny M, HIV-1 skupiny O, HIV-2, HCV nebo HBV přidaných v trojnásobné koncentraci detekční hranice testu pro každý virus. Testované mikroorganismy s testem cobas TaqScreen MPX nevytvářely křížovou reakci a neovlivňovaly použitý test.

Analytická specifita – vybraná onemocnění

Vzorky plazmy každé v závorce uvedených onemocnění (infekce cytomegalovirem, infekce virem hepatitidy A, infekce virem Epstein - Barrové a autoimunní onemocnění, tj. např. přítomné antinukleární protilátky, revmatoidní artritida) byly testovány stejně jako v předchozím případě s a bez HIV-1 skupiny M, HIV-1 skupiny O, HIV-2, HCV nebo HBV přidaných v trojnásobné koncentraci detekční hranice testu pro každý virus. Kromě jednoho vzorku (vzorek byl po přetestování negativní) uvedená onemocnění nenarušovala senzitivitu nebo specifitu testu.

Potenciálně interferující látky

1) Endogenní interferující látky

Vzorky plazmy s abnormálně vysokými úrovněmi triglyceridů (až do 3 186 mg/dl), hemoglobinu (až do 472 mg/dl), nekonjugovaného bilirubinu (až do 63 mg/dl), albuminu (až do 9,6 g/dl) nebo lidské DNA (až do 0,4 mg/dl) byly testovány s a bez přidání HIV-1 skupiny M, HIV-1 skupiny O, HIV-2, HCV nebo HBV přidaných v trojnásobné koncentraci detekční hranice testu pro každý virus. Uvedené endogenní látky nenarušovaly senzitivitu nebo specifitu testu.

Erytrocyty ve vzorcích plazmy ve 2,5 % obj. nenarušovaly senzitivitu nebo specifitu testu. Erytrocyty ve vzorcích plazmy v 5 % obj. snižovaly senzitivitu testu.

2) Exogenní interferující látky

Vzorky normální lidské plazmy obsahující abnormálně vysokou koncentraci acetaminofenu (paracetamolu) (1 324 $\mu\text{mol/l}$), kyseliny acetylsalicylové (3,62 $\mu\text{mol/l}$), kyseliny askorbové (342 $\mu\text{mol/l}$), atorvastatinu (600 Eq/l), fluoxetinu (11,2 $\mu\text{mol/l}$), ibuprofenu (2 425 $\mu\text{mol/l}$), loratadinu (0,78 $\mu\text{mol/L}$), nadololu (3,88 $\mu\text{mol/l}$), naproxenu (2 170 $\mu\text{mol/l}$), paroxetinu (3,04 $\mu\text{mol/l}$), penyleprinu HCl (491 $\mu\text{mol/l}$) a sertralinu (1,96 $\mu\text{mol/l}$) při testování stejným způsobem jako u výše uvedených skupin látek neovlivňovaly senzitivitu nebo specifitu testu.

8.3.1.8 Diagnostické okno (window perioda) testu cobas TaqScreen MPX pro jednotlivé infekce

Window perioda (diagnostické okno) je při použití molekulárně biologické metody RT-Real Time PCR s testem cobas TaqScreen MPX na systému cobas s201 u sledovaných infekcí kratší než při použití standardních imunoanalytických metod, u HCV velmi výrazně. Přehled window period u sledovaných infekcí viz tabulka č. 16 a č. 17.

Tabulka 16: Window perioda (diagnostické okno) u sledovaných infekcí při použití testu cobas TaqScreen MPX⁸⁰

Virus	Window perioda (diagnostické okno)
HCV	13 dní
HIV	10 dní
HBV	20 dní

⁸⁰ Zdroj: Bush M.P. , Closing the Windows on Viral Transmission by Blood Transfusion. In: Blood Safety in the New Milleium, AABB, 2001.

Tabulka 17: Porovnání window period při použití obou typů testování⁸¹

Virus	Imunoanalytické metody (Architect i2000)	Test cobas TaqScreen MPX (cobas s201)
HCV	50 dní a více	13 dní
HIV	17 dní	10 dní
HBV	6 týdnů	20 dní

8.4 Přehled a interpretace naměřených dat

Výsledky testování jsou rozděleny, obdobně jako vyšetřované vzorky, do dvou skupin. První skupinu dat (č.1) tvoří výsledky vyšetření vzorků z první skupiny tj. testování 5074 vzorků získaných od všech dárců na FTO VFN bez další selekce, doplněné o předchozí archivní vzorky od dárců, kteří byli při testování na cobas s201 označeni jako reaktivní.

Druhou skupinu výsledků (č.2) tvoří výsledky testování vzorků vybraných speciálně za účelem NAT z archivních vzorků ve FTO VFN.

8.4.1 Výsledky testování první skupiny vzorků (č.1)

Celkem bylo vyšetřeno 5074 vzorků, kdy převážná většina vzorků (4917 vzorků) byla vyšetřena v režimu „Primery Pooling“, tedy ve standardním režimu testování při poolech ze šesti vzorků. Některé vzorky (29 vzorků) byly testovány z různých důvodů (např. doplnění kapacity, testování archivních vzorků při zjištění reaktivitě, časové důvody apod.) v režimu „Individual Pooling“ tedy při samostatné analýze jednotlivých vzorků. Pokud nedošlo při analýze poolu vzorků nebo individuálního vzorku na systému cobas s201 k dokončení testování (např. detekce sraženiny v plasmě, chybné pipetování apod.), byla tato série znovu vyšetřena v režimu „Repeat Pooling“ (72 vzorků), tyto vzorky jsou systémem označeny jako „Repeat Needed“.

⁸¹ Zdroj: Vlastní zpracování dle materiálu Abbott Laboratories , s.r.o., Diagnostics Division, Czech republic a Roche, s.r.o., Molecular Diagnostics, Czech republic

V režimu „Resolution pooling“ – tedy v další analýze na systému cobas s201, je-li primární pool označen jako reaktivní (výsledek označen na systému cobas s201 jako „Complete, Reactive“ a pro pool dále jako „Resolution Needed“), bylo vyšetřeno 56 vzorků.

Na systému Architect i2000 byly všechny vzorky vyšetřeny ve standardním režimu, při reaktivitě bylo prováděno další rozhodovací testování v dubletu. Je-li výsledek rozhodovacího testování reaktivní, je vzorek označen jako „opakovaně reaktivní“ na daný marker a dále testován v Národní referenční laboratoři (NRL).

8.4.1.1 Negativní vzorky

Většina vyšetřených vzorků je označena systémem cobas s201 jako „Complete, Non reactive“ a u systému Architect i2000 jako „negativní“.

8.4.1.2 Reaktivní vzorky

Přehled reaktivních vzorků (první skupina) je rozdělen dle typu použitého vyšetřovacího systému.

Tabulka 18: Přehled vzorků reaktivních na systému Architect i2000 (skupina vzorků č.1)⁸²

	Abbott CMIA					
	<i>anti-HCV</i>		<i>HBsAg</i>		<i>HIV Ag/Ab Combo</i>	
	[vzorky]	[%]	[vzorky]	[%]	[vzorky]	[%]
Reaktivní	15	0,30	4	0,08	12	0,24
	Výsledky dalšího testování v NRL					
	[vzorky]	[%]	[vzorky]	[%]	[vzorky]	[%]
Negativní	8	0,16	1	0,02	10	0,20
Nejasný	7	0,14	2	0,04	2	0,04
Pozitivní	0	-	1	0,02	0	-

⁸² Zdroj: Vlastní zpracování

Dárci s nejasným výsledkem testování opakovaně reaktivního vzorku ze systému Architect i2000 v Národní referenční laboratoři, byli následně re-testováni z dalšího vzorku (odběr za tři měsíce), všichni s negativním výsledkem. Nejvyšší procento falešně pozitivních výsledků je patrné pro marker anti-HCV (0,30%).

Tabulka 19: Přehled vzorků reaktivních na systému cobas s201 (skupina vzorků č.1)⁸³

Vzorek (dárce)	Typ dárce	Číslo oběru	Datum odběru	Typ odběru	Odběrové místo	s201	Architect i2000
D.M.	PD	08003078	13.6.2008	PK	Karlovo nám.	reaktivní	op. reak.
A.J.	OD	08730476	19.2.2008	PK	OC Kadaň	reaktivní	negativní
P.H.	OD	08730487	19.2.2008	PK	OC Kadaň	reaktivní	negativní
D.K.	OD	08730480	19.2.2008	PK	OC Kadaň	reaktivní	negativní
Ž.L.	OD	08730483	19.2.2008	PK	OC Kadaň	reaktivní	negativní
P.J.	OD	08730485	19.2.2008	PK	OC Kadaň	reaktivní	negativní
V.L.	OD	08730486	19.2.2008	PK	OC Kadaň	reaktivní	negativní
H.A.	OD	08200760	30.5.2008	PK	Výjezd (Jinočany)	reaktivní	negativní

Legenda:

PD – prvodárce

OD – opakovaný dárce

PK – odběr plné krve

s201 – výsledek vyšetření na systému cobas s201

Architect i2000 – výsledek vyšetření na systému Architect i2000

op. reak. – opakovaně reaktivní

Další testování reaktivních vzorků ze systému Architect i2000

Vzorek D.M. byl označen jako „opakovaně reaktivní“ na přítomnost HBsAg (Abbott CMIA, HBsAg >250 S/CO). Tento vzorek byl dále testován v Národní referenční laboratoři pro virové hepatitidy (což odpovídá standardním postupům používaným ve FTO VFN při zjištění reaktivity virových markerů), kde byl vzorek po provedení konfirmačních vyšetření označen jako HBV pozitivní (resp. dárce byl označen jako HBV pozitivní). Reaktivita vzorku dárce D.M. byla zjištěna i při testování na systému cobas s201.

⁸³ Zdroj: Vlastní zpracování

Kopie *Protokolu o výsledcích laboratorních zkoušek z NRL*⁸⁴ pro virové hepatitidy, včetně přehledu použitých metod viz příloha č. 3.

Další testování reaktivních vzorků ze systému cobas s201

Všechny vzorky reaktivní na systému cobas s201 pocházejí z odběrů plné krve opakovaných dárců krve a krevních složek, s výjimkou vzorku dárce D.M. , který daroval plnou krev poprvé. Odběry pravidelných dárců z odběrového centra Kadaň byly uskutečněny během jednoho dne.

Testování reaktivních vzorků v NRL

Vzorek D.M. nebyl, z důvodu pozitivní confirmace v NRL pro virové hepatitidy, dále testován. Vzorek D.M. lze tedy označit jako pozitivní nezávislou kontrolu procesu vyšetřování na systému cobas s201.

Všechny ostatní vzorky (7 vzorků) označené systémem cobas s201 jako reaktivní byly zaslány do NRL pro hepatitidy pro rozlišení typu infekce (HBV, HCV) pomocí NAT. Výsledky testování jsou uvedeny v tabulce č. 20. Kopie *Protokolu o výsledcích laboratorních zkoušek z NRL* je obsahem přílohy č.4.

Vzhledem k nízké pravděpodobnosti positivity HIV, byly reaktivní vzorky po konzultaci s vedoucím NRL pro AIDS testovány na přítomnost markerů HIV infekce pouze imunoanalytickými metodami. Vzorky dárců P.J. a H.A. nebyly v NRL pro AIDS testovány z důvodu nedostatku materiálu. Výsledky testování v NRL pro AIDS jsou uvedeny v tabulce č. 21. Kopie *Protokolu o výsledku vyšetření HIV* je obsahem přílohy č. 5.

⁸⁴ Národní referenční laboratoř

Tabulka 20: Přehled testování vzorků reaktivních na systému cobas s201 v NRL pro virové hepatitidy⁸⁵

Vzorek (dárce)	Výsledek NAT testování		Číslo vzorku NRL	Datum testování
	HCV-RNA	HBV-DNA		
A.J.	pozitivní < 45 IU/ml	negativní	2291/08	3.11.2008
P.H.	negativní	negativní	2324/08	6.11.2008
D.K.	pozitivní < 60 IU/ml	negativní	2326/08	6.11.2008
Ž.R.	pozitivní < 60 IU/ml	negativní	2327/08	6.11.2008
P.J.	pozitivní 1160 IU/ml	negativní	2325/08	6.11.2008
V.L.	pozitivní 161 IU/ml	negativní	2328/08	6.11.2008
H.A.	negativní	negativní	2813/08	18.12.2008

Výsledky NAT testování jsou udávány v mezinárodních jednotkách (IU/ml). Nejnižší kvantitativní hodnotou, kterou NAT v NRL produkuje u HCV-RNA je < 15 IU/ml. Vzhledem ke spotřebě vzorku při testování jsou vzorky v NRL ředěny. Je-li tedy výsledek testování ředěného vzorku < 15 IU/ml (ředění v poměru 1:3), je výsledná hodnota < 60 IU/ml. Pokud byl vzorek ředěn v poměru 1:2, je výsledek stanovení < 45 IU/ml.

Tabulka 21: Přehled testování vzorků reaktivních na systému cobas s201 v NRL pro AIDS⁸⁶

Vzorek (dárce)	Výsledek testování v NRL pro AIDS	Číslo vzorku NRL	Datum testování
A.J.	negativní	112680/13 PL1	19.11.2008
P.H.	negativní	112682/13 PL1	19.11.2008
D.K.	negativní	112683/13 PL1	19.11.2008
Ž.R.	negativní	112684/13 PL1	19.11.2008
P.J.	-	-	-
V.L.	negativní	112681/13 PL1	19.11.2008

⁸⁵ Zdroj: Vlastní zpracování

⁸⁶ Zdroj: Vlastní zpracování

Závěr

Pět ze sedmi testovaných vzorků, které byly na systému cobas s201 označeny jako reaktivní, bylo v NRL pro virové hepatitidy vyhodnoceno jako HCV-RNA pozitivní. Ve dvou případech lze pozitivitu kvantifikovat (vzorky P.J., V.L.), u ostatních vzorků je výsledná pozitivita velmi slabá a spolehlivě kvantifikovat ji nelze. Výsledky testování v NRL pro AIDS jsou u všech vyšetřovaných vzorků negativní, další vzorky těchto dárců v NRL pro AIDS nebyly testovány.

Testování archivních vzorků dárců, reaktivních na systému cobas s201

Pro potvrzení reaktivity, vyloučení kontaminace a detailní rozbor výsledků byly u reaktivních vzorků resp. dárců testovány následně jejich související:

- archivní vzorky z odběrů reaktivních na systému cobas s201 a negativních na systému Architect i2000,
- další archivní vzorky z následných odběrů těchto dárců (všechny následné odběry-vzorky od těchto reaktivních dárců nebyly metodou CMIA při standardním vyšetření označeny jako reaktivní), v případě nedostatku materiálu v archivu laboratoří FTO VFN byly použity vzorky z plazmy v karanténě,
- další vzorky NAT na systému cobas s201, které se dostaly do výběru během cca 3 měsíců shromažďování vzorků.

Testování probíhalo metodou NAT na systému cobas s201 a v Národní referenční laboratoři pro virové hepatitidy buď NAT metodou (testování HBV-DNA, HCV-RNA) nebo serologickými metodami (HBsAg, anti-HBc, anti-HBs, anti-HBe, anti-HCV).

Přehled výsledků testování je uveden v následujících tabulkách.

Tabulka 22: Přehled testování archivních vzorků z odběrů, které byly na systému cobas s201 označeny jako reaktivní v NRL pro virové hepatitidy⁸⁷

Vzorek (dárce)	Testování na s201	Testování v NRL pro virové hepatitidy			
		HCV-RNA	HBV-DNA	Číslo vzorku	Datum
A.J.	negativní	negativní	negativní	2812/08	18.12.2008
P.H.	negativní	-	-	-	-
D.K.	negativní	-	-	-	-
Ž.R.	negativní	-	-	-	-
P.J.	reaktivní	pozitivní < 15 IU/ml	negativní	2810/08	18.12.2008
V.L.	reaktivní	pozitivní 657 IU/ml	negativní	2811/08	18.12.2008
H.A.	negativní	-	-	-	-

Testování archivních vzorků u dárců H.A. a P.H. v NRL neproběhlo. Důvodem byla negativita výsledků konfirmačních vyšetření vzorků reaktivních na cobas s201 v NRL pro virové hepatitidy (viz. tabulka č.20), kterou potvrzuje i negativita archivních vzorků vyšetřených na systému cobas s201. Kvůli nedostatku materiálu v mikrotitrační destičce archivu laboratoře FTO VFN nebyly testovány ani archivní vzorky dárců D.K. a Ž.R.

Kopie *Protokolu o výsledcích laboratorních zkoušek z NRL* je obsahem přílohy č.6.

Další výsledky testování ostatních archivních vzorků z následných odběrů od těchto sedmi dárců (archiv), jejich dalších vzorků, které se objevily ve výběru vzorků pro NAT testování (pcr) doplněné o vzorky získané z karanténní plazmy (plazma), jsou uvedeny v následující tabulce.

⁸⁷ Zdroj: Vlastní zpracování

Tabulka 23: Přehled dalších vyšetřovaných vzorků dárců reaktivních na systému cobas s201⁸⁸

Dárce A.J.					
Číslo odběru	08731464	08732398	08732398	08733377	-
Datum odběru	21.5.2008	28.8.2008	28.8.2008	27.11.2008	-
Typ vzorku	archiv	pcr	plazma	plazma	-
Testování na	s201	s201	NRL	s201	-
Výsledek	negativní	negativní	negativní	negativní	-
Dárce P.H.					
Číslo odběru	08731446	08732419	08732419	08733498	08733498
Datum odběru	20.5.2008	28.8.2008	28.8.2008	4.12.2008	4.12.2008
Typ vzorku	archiv	pcr	plazma	plazma	archiv
Testování na	s201	s201	NRL	s201	s201
Výsledek	negativní	negativní	negativní	negativní	negativní
Dárce D.K.					
Číslo odběru	08731340	08732353	08732353	09730210	-
Datum odběru	13.5.2008	26.8.2008	26.8.2008	22.1.2009	-
Typ vzorku	archiv	pcr	plazma	archiv	-
Testování na	s201	s201	NRL	s201	-
Výsledek	negativní	negativní	anti-HBs	negativní	-
Dárce Ž.R.					
Číslo odběru	08731441	08732300	08733289	-	-
Datum odběru	20.5.2008	20.8.2008	20.11.2008	-	-
Typ vzorku	archiv	plazma	plazma	-	-
Testování na	s201	NRL	s201	-	-
Výsledek	negativní	anti-HBs	negativní	-	-
Dárce P.J.					
Číslo odběru	08731432	08733304	-	-	-
Datum odběru	20.5.2008	20.11.2008	-	-	-
Typ vzorku	archiv	plazma	-	-	-
Testování na	s201	s201	-	-	-
Výsledek	negativní	negativní	-	-	-
Dárce V.L.					
Číslo odběru	08731447	08732418	08732418	08733499	08733499
Datum odběru	20.5.2008	20.8.2008	20.8.2008	4.12.2008	4.12.2008
Typ vzorku	archiv	pcr	plazma	plazma	archiv
Testování na	s201	s201	NRL	s201	s201
Výsledek	negativní	negativní	negativní	negativní	negativní
Dárce H.A.					
Číslo odběru	08200928	08201327	08201327	-	-
Datum odběru	5.9.2008	28.11.2008	28.11.2008	-	-
Typ vzorku	pcr	pcr	plazma	-	-
Testování na	s201	s201	s201	-	-
Výsledek	negativní	negativní	negativní	-	-

⁸⁸ Zdroj: Vlastní zpracování

Poznámka k tabulce

Výsledky vyšetření všech infekčních markerů testovaných ve FTO VFN standardně používanými metodami (CMIA, systém Architect i2000) byly pro všechny vzorky uvedené v tabulce negativní.

Dárce P.J. – u tohoto dárce byla plazma z následného odběru uskutečněného v srpnu 2008 zničena pro zvýšené hodnoty ALT. Proto nebyla v NRL pro virové hepatitidy tato plazma testována. Testována byla plazma až z dalšího odběru uskutečněného v listopadu 2008. Testování proběhlo na systému cobas s201.

Pro vyšetření serologie hepatitid byla vzorkům v NRL pro virové hepatitidy přidělena následující čísla: dárce A.J. (č.2373/08), dárce D.K. (č.2376/08), dárce Ž.R. (č.2377/08), dárce V.L. (č.2374/08), vzorky byly k testování do NRL pro virové hepatitidy přijaty 13.11.2008.

Všechny vzorky z následných odběrů od reaktivních dárců byly při testování metodou NAT na systému cobas s201 negativní, u testování HBsAg, anti-HBc, anti-HBs, anti-HBe, anti-HCV v NRL pro virové hepatitidy byly u dvou dárců (dárce D. K. a Ž. R.) výsledky pozitivní. Konkrétně byly pozitivní protilátky anti-HBs. Dle informace z odběrového centra Kadaň byli oba tito dárce očkováni proti HBV.

Z výše uvedených výsledků je zřejmé, že příčinou reaktivity původních vzorků byla kontaminace v preanalytické fázi a další reaktivita některých archivních vzorků těchto dárců (viz tabulka č. 23) byla způsobena kontaminací při pipetování archivní mikrotitrační destičky. Tento závěr potvrzuje skutečnost, že ve stejný den (19.2.2008) byl vyšetřen v rutinním provozu FTO VFN metodou CMIA vzorek z OC Kadaň (číslo odběru 08730478, dárce V.I.) s výsledkem anti-HCV opakovaně reaktivní, který byl na základě konfirmačních vyšetření provedených v NRL pro virové hepatitidy uzavřen jako pozitivní.

Vzorek dárce V.I. se nedostal mezi vzorky pro NAT testování, protože plazma byla spolu s tímto vzorkem zničena na oddělení výroby ještě před zamražením (na pokyn kvalifikované osoby v ZTS z důvodu opakované reaktivity při vyšetření protilátek anti-HCV na systému Architect i2000).

Zásadní roli při testování sehrála i skutečnost, že ještě před výše uvedeným zničením plazmy, konkrétně při vlastní přípravě vzorků pro NAT testování (vzorky z OC Kadaň), došlo v důsledku nedostatečné desinfekce peanu používaného k nastřihávání hadiček před náběrem vzorku ke kontaminaci dalších vzorků dotčeným reaktivním vzorkem. To potvrdil i klesající obsah virových částic (IU/ml) při vyšetření těchto vzorků v NRL pro virové hepatitidy.

Archivní mikrotitrační destička (připravována 21.2.2008) byla v té době připravována manuálním pipetováním vyšetřených vzorků (cca 1,2 ml). Kontaminace dvou vzorků archivu byla tedy také způsobena chybou při pipetování – viz schéma pipetování jednotlivých vzorků na obrázku č. 14 a č. 15.

Obrázek 14: Pozice testovaných vzorků na archivní desce⁸⁹

Soupis Archivu							
Číslo desky		43/08	doplň	datum:		21.2.2008	
poz	číslo odběru	poz	číslo odběru	poz	číslo odběru	poz	číslo odběru
1	08500582	25	08730480	49	08730506	73	08000888
2	08500583	26	08730481	50	08730507	74	08000889
3	08500584	27	08730482	51	08730508	75	08000890
4	08500585	28	08730483	52	08730509	76	08000891
5	08500586	29	08730484	53	08730510	77	08000892
6	08500587	30	08730485	54	08730511	78	08000893
7	08500588	31	08730486	55	08730512	79	08000894
8	08500589	32	08730487	56	08730513	80	08400387
9	08500590	33	08730488	57	08730514	81	08400388
10	08500591	34	08730489	58	08730515	82	08400389
11	08500592	35	08730490	59	08730517	83	08400390
12	08500593	36	08730491	60	08000873	84	08400391
13	08500594	37	08730492	61	08000874	85	08400392
14	08500595	38	08730493	62	08000875	86	08400393
15	08500596	39	08730495	63	08000876	87	08400394
16	08500597	40	08730496	64	08000877	88	08400395
17	08300086	41	08730497	65	08000878	89	08900060
18	08300087	42	08730498	66	08000879	90	08900325
19	08300088	43	08730500	67	08000880	91	08200230
20	08730475	44	08730501	68	08000881	92	08200231
21	08730476	45	08730502	69	08000883	93	08200232
22	08730477	46	08730503	70	08000884	94	08200233
23	08730478	47	08730504	71	08000886	95	08200234
24	08730479	48	08730505	72	08000887	96	08200235

Pozice testovaných vzorků na archivní desce:

- č. 21 - dárec A.J.
- č. 23 - dárec V.I. (potenciální zdroj kontaminace)
- č. 25 - dárec D.K.
- č. 28 - dárec Ž.R.
- č. 30 - dárec P.J.
- č. 31 - dárec V.L.
- č. 32 - dárec P.H.

Jaroslava Bouzková

⁸⁹ Zdroj: Vlastní zpracování

Obrázek 15: Schéma záznamu pozic archivních vzorků na destičce 43/08⁹⁰

Pozice	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96

Legenda:

Barevně jsou označeny pozice pipetovaných vzorků na archivní desce č. 43/08. Červeně je zvýrazněn dárce V. I., potenciální zdroj kontaminace archivní desky (č. 23), oranžově dva archivní vzorky, u nichž je výsledek testování na systému cobas s201 reaktivní - dárce P. J. (č. 30) a V. L. (č. 31) a šedou barvou jsou označeny ostatní vzorky dárců, u kterých je NAT na cobas s201 negativní – dárce A. J. (č. 21), D. K. (č. 25), Ž. R. (č. 28) a P. H. (č. 32).

8.4.1.3 Závěry pro testování první skupiny vzorků

Reaktivita šesti vzorků dárců z OC Kadaň (A.J., D.K., Ž.R., P.J, V.J., P.H.) byla způsobena kontaminací v preanalytické fázi. Následné vyšetření archivních vzorků těchto reaktivních dárců potvrdilo u dvou vzorků reaktivitu, která však byla také způsobena kontaminací (pozitivní dárce V.I.) při přípravě archivní mikrotitrační destičky. Na základě těchto skutečností byl zrevidován postup desinfekce pomůcek na oddělení výroby a od března roku 2011 se používá ve FTO VFN pro přípravu archivačních destiček automatický pipetor.

Reaktivita vzorku H.A. (reaktivní na cobas s201, v NRL pro virové hepatitidy negativní, CMIA negativní, vyšetření všech dalších vzorků tohoto dárce bylo vždy negativní) byla velmi pravděpodobně způsobena kontaminací.

⁹⁰ Zdroj: Vlastní zpracování

Ke kontaminaci mohlo dojít během manipulace v PCR laboratoři (není však známý její zdroj) nebo mohlo ke kontaminaci dojít během přípravy vzorků pro NAT testování na oddělení výroby stejně jako tomu bylo u vzorků dárců z OC Kadaň – potenciální kontaminující vzorek ze stejného dne (30.5.2008) je vzorek dárce Č.I. (č.odběru: 08200794), opakovaně reaktivní na systému Architect i2000 (HBsAg) v NRL pro virové hepatitidy potvrzen jako nejasný. Archivní vzorek dárce Č. J. byl pipetován do jiné mikrotitrační destičky než negativní archivní vzorek dárce H.A.

Testování všech vzorků první skupiny pomocí testu cobas TaqScreen MPX bylo uzavřeno s výsledkem negativní (s výjimkou HBV potvrzeného prvodárce D.M.).

8.4.2 Výsledky testování druhé skupiny vzorků (č.2)

Vzhledem k nízké prevalenci infekce virem HBV a HCV v běžné populaci, tedy i v populaci dobrovolných dárců krve (prevalence HBV infekce, respektive HBsAg pozitivita v běžné populaci je cca 0,5% a prevalence protilátek anti-HCV je 0,2%) a počtu testovaných vzorků (bylo testováno cca 5000 vzorků od 4000 dárců) byla pravděpodobnost záchytu infekce metodou NAT u prvodárce nebo opakovaného dárce, u něhož byly výsledky testování sledovaných infekčních markerů standardně používanou metodou CMIA negativní, velmi nízká.

Tento předpoklad, který byl potvrzen výsledky testování vyšetřovaného souboru č.1, vedl k rozhodnutí otestovat pomocí NAT testu cobas TaqScreen MPX další, cíleně vybranou skupinu dárců.

8.4.2.1 Výběr vzorků pro testování

Do této skupiny byly zařazeny vzorky pouze *opakovaných* dárců krve a krevních složek, kteří byli potenciálně odebráni v diagnostickém okně, a to v souvislosti s některou ze sledovaných infekcí. K testování byl tedy vybrán archivní vzorek (vzorek z předchozího odběru od opakovaného dárce), jehož následný/dotčený odběr byl na systému Architect i2000 metodou CMIA označen jako opakovaně reaktivní a poté byl na základě výsledku vyšetření v Národní referenční laboratoři pro virové hepatitidy dárce potvrzen jako pozitivní.

Pro testování byly vybírány vzorky dárců z období od dubna roku 2004 (od tohoto data jsou archivní vzorky k dispozici) do února roku 2009 (v únoru 2009 byla studie ukončena, tj. bylo ukončeno testování na systému cobas s201).

Poznámka k archivu vzorků: ZTS jsou povinna archivovat vzorky dle Vyhlášky 143/2008 Sb. v platném znění. (Příloha č.1 k vyhlášce č.143/2008 Sb., Kapitola 9. Kontroly jakosti, bod 4.)

Podmínky výběru druhého testovaného souboru (opakovaný dárcce, který byl v.s. odebrán v diagnostickém okně) v určeném období splnilo **pouze 5 archivních vzorků opakovaných dárců**. Výběr byl proveden z cca 150 tisíc vyšetřených vzorků opakovaných dárců krve a krevních složek. Interval mezi jednotlivými odběry dárcce, který se dostal do výběru, tj. interval od předchozího negativního odběru do následného pozitivního odběru, se pohybuje mezi 3 – 8 měsíci, dárcce tedy daroval krev v průměru jedenkrát za 4,4 měsíce. Přehled pozitivně konfirmovaných dárců (prvodárců i opakovaných dárců) na všechny sledované infekce, a to jak ve FTO VFN, tak v ZTS celé České republiky od roku 2004 do roku 2010, je uveden v tabulkách č. 24 a č. 25. Počty vyšetřených vzorků a dárců ve FTO VFN a v ZTS České republiky jsou znázorněny v grafech č. 3 a č. 4. Data jsou získána z Ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky (ÚZIS).

Tabulka 24: Dárci pozitivně konfirmovaní v NRL (2004-2010, FTO VFN)⁹¹

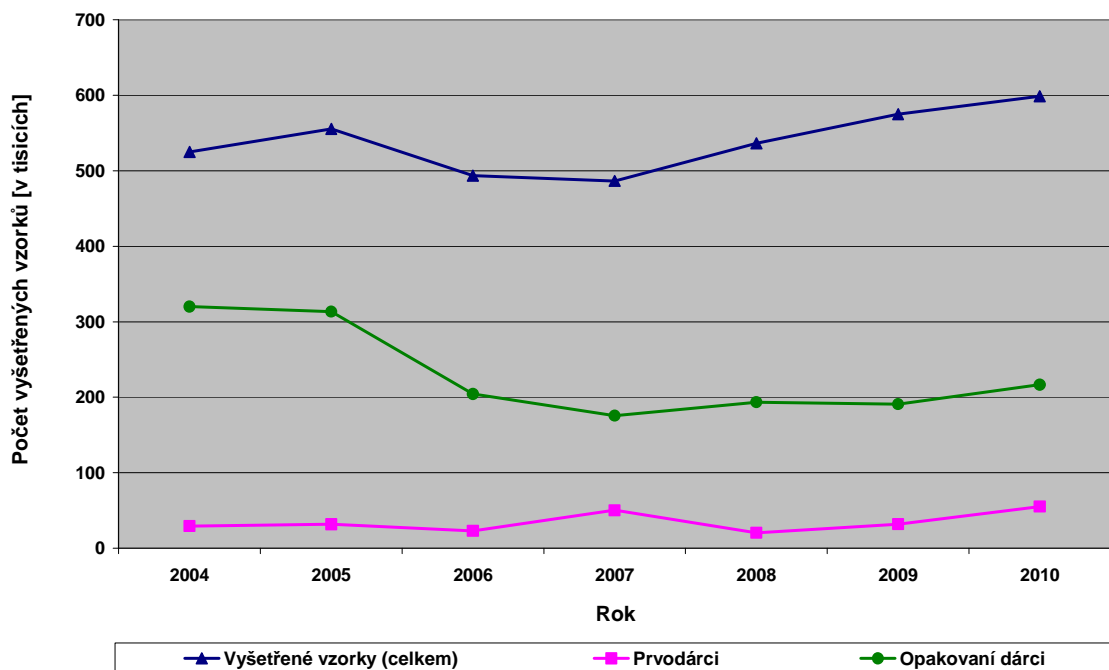
Počet vyšetřených vzorků								
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	CELKEM
Vyšetřené vzorky (tis.)	40,57	40,04	35,47	32,19	28,63	29,15	29,45	235,5
Dárci (tis.)	-	14,89	13,23	12,82	11,26	11,75	11,9	-
Prvodárci (tis.)	2,01	1,1	0,66	1,84	1,93	2,77	2,53	12,8
Opakování (tis.)	-	13,79	12,57	10,98	9,33	8,98	9,37	-
Pozitivně konfirmovaní dárci (opakovaní dárci)								
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	CELKEM
HIV Ab+Ag	0	0	0	0	0	0	0	0,0
HBsAg	0	0	0	0	0	2	0	2,0
anti-HCV	2	2	0	1	0	0	1	6,0
Pozitivně konfirmovaní dárci (prvodárci)								
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	CELKEM
HIV Ab+Ag (%)	1	0	1	0	0	1	2	5,0
HBsAg (%)	2	2	0	1	2	1	1	9,0
anti-HCV (%)	4	1	5	2	2	2	0	16,0

⁹¹ Zdroj: ÚZIS

Tabulka 25: Dárci pozitivně confirmovaní v NRL (2004-2010, ČR)⁹²

Počet vyšetřených vzorků								
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	CELKEM
Vyšetřené vzorky (tis)	525	555,6	493,7	486,7	536,5	574,9	598,7	3771,1
Dárci (tis)	349,3	345	227	225,7	213,8	222,7	271,9	-
Prvodárci (tis.)	29,3	31,7	22,9	50,13	20,3	31,9	55,2	241,4
Opakovaní (tis.)	320,00	313,30	204,10	175,57	193,50	190,80	216,70	-
Pozitivně confirmovaní dárci (opakovaní dárci)								
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	CELKEM
HIV Ab+Ag	1	2	1	2	1	2	8	17,0
HBsAg	51	30	7	11	8	9	20	136,0
anti-HCV	71	56	13	5	18	3	22	188,0
Pozitivně confirmovaní dárci (prvodárci)								
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	CELKEM
HIV Ab+Ag (%)	1	0	1	1	0	2	3	8,0
HBsAg (%)	24	21	9	19	17	18	15	123,0
anti-HCV (%)	63	42	29	29	16	31	19	229,0

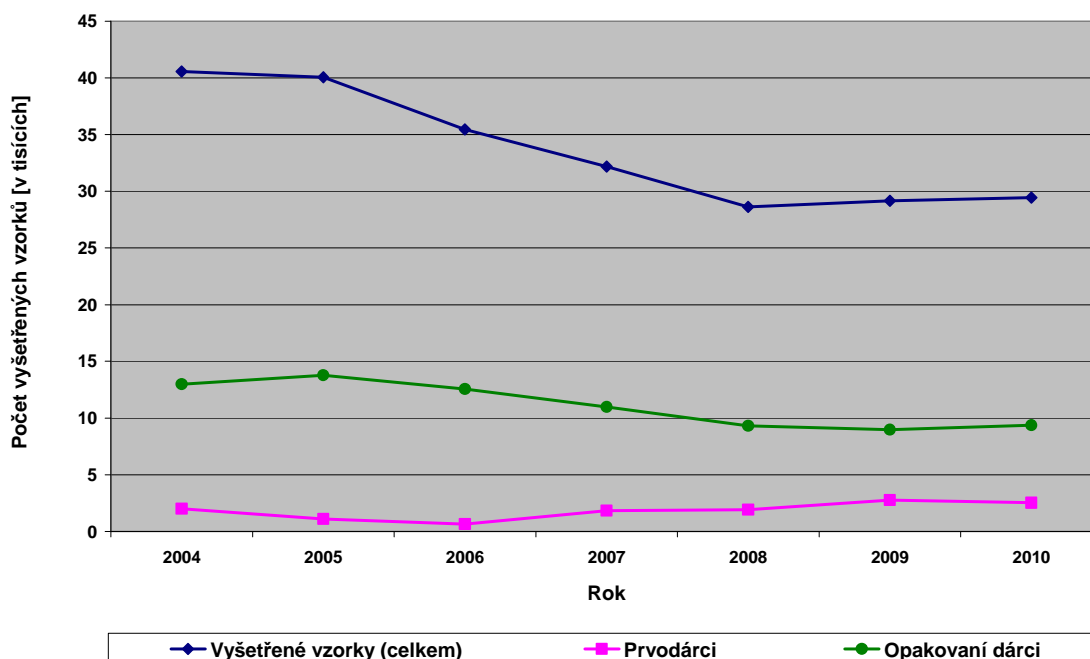
Graf 3: Počet vyšetřených vzorků opakovaných dárců a prvodárců v České republice (2004 – 2010)⁹³



⁹² Zdroj: ÚZIS

⁹³ Zdroj: ÚZIS

Graf 4: Počet vyšetřených vzorků opakovaných dárců a prvodárců ve FTO VFN (2004 – 2010)⁹⁴



Dle statistiky poskytnuté ÚZIS, stoupá v České republice od roku 2007 počet vzorků vyšetřených v zařízeních transfuzní služby především díky zvyšujícímu se počtu opakovaných dárců a od roku 2008 i zvyšujícímu se počtu vyšetřených prvodárců.

Ve Fakultním transfuzním oddělení Všeobecné fakultní nemocnice má naopak jak celkový počet vyšetřených vzorků, tak i počet vyšetřených vzorků opakovaných dárců klesající tendenci, v posledních dvou letech stagnující. Od roku 2007 počet vyšetřených prvodárců ve FTO narůstá, stejně jako v celé České republice.

8.4.2.2 Výsledky testování na systému cobas s201

Jak bylo uvedeno výše, v období od dubna roku 2004 do února 2009 bylo ve FTO VFN celkem pět opakovaných dárců krve a krevních složek, u kterých byl výsledek testování pomocí metody CMIA hodnocen jako opakovaně reaktivní a následně v NRL pro virové hepatitidy pozitivně confirmován. Všichni tito dárči byli pozitivně confirmováni v souvislosti s infekcí hepatitidou C.

⁹⁴ Zdroj: ÚZIS

Předchozí odběry resp. vzorky z těchto odběrů nebyly u dvou dárců v archivu laboratoří k dispozici - u jednoho z dárců byl předchozí vzorek odebrán v roce 2002, tedy v době před vznikem archivu (vzorek dárce G.R., č. odběru: 04715665, datum odběru: 17.8.2004) a u druhého dárce (vzorek dárce P.V., č. odběru: 04715071, datum odběru: 13.7.2004) byl předchozí vzorek (č.odběru: 01710494, datum odběru: 13.11.2001) již v NRL pro virové hepatitidy testován v minulosti s výsledkem nejasný.

Celkem tedy byly ve druhé skupině dárců na systému cobas s201 testovány tři vzorky – viz tabulka č. 26. Testování proběhlo v režimu individual pooling. Kopie *Protokolu o výsledcích laboratorních zkoušek z NRL pro virové hepatitidy* (z potvrzení těchto dárců v NRL pro virové hepatitidy) je obsahem přílohy č.7.

Tabulka 26: Výsledky testování druhé skupiny vzorků na systému cobas s201⁹⁵

Vzorek dárce	L.L.	G.P.	M.J.
Vzorek CMIA reaktivní (pozitivní konformace v NRL, vše HCV)	04728224	05710781	07400012
Datum odběru	12.10.2004	3.2.2005	3.1.2007
Archivní vzorek testovaný na cobas s201 (CMIA negativní)	04724968	04714658	06402442
Datum odběru (archivní vzorek)	14.6.2004	23.6.2004	31.10.2006
Výsledek testování na cobas s201	invalid	invalid	invalid

Celý vyšetřovaný soubor („batch“) byl vyhodnocen systémem jako „invalid“, tedy neplatný. Důvodem, uvedeným v PDM softwaru systému cobas s201, byly rozdílné šarže použitého kontrolního materiálu - vnitřních pozitivních kontrol a kontroly negativní. Nepodařilo se zjistit, zda šlo o chybu obsluhy, systému nebo výrobce kontrol, protože pro daný testovaný soubor bylo standardně použito zcela v souladu s předchozím postupem nové balení kontrolního materiálu. U jednoho ze vzorků (vzorek M.J.) navíc systém označil chybu pipetování resp. nedostatečné množství vzorku. Kopie primární dokumentace z neplatného batche systému cobas s201 je obsahem přílohy č.8.

Všechny vzorky uvedené v tabulce č.25 byly na systému cobas s201 testovány na konci celé studie (únor 2009), jednalo se o závěrečné testování v rámci celé studie.

⁹⁵ Zdroj: Vlastní zpracování

8.4.2.3 Testování na ÚKBLD VFN

Před uzavřením celé studie v březnu roku 2010 bylo rozhodnuto otestovat znovu pomocí NAT všechny vzorky z druhé skupiny, jejichž testování na systému cobas s201 nebylo možné vyhodnotit. Během roku 2009 byly pozitivně potvrzeny v NRL pro virové hepatitidy další dva vzorky opakovaných dárců z FTO VFN v souvislosti s infekcí virem hepatitidy B a C, konkrétně vzorek – dárce V.K. (č.odběru: 09500638, datum odběru: 26.3.2009) a dárce G.G. (č.odběru: 09300359, datum odběru: 6.8.2009). Protože archivní vzorek z předchozího odběru dárce G.G. nebyl v archivu laboratoří VFN k dispozici (odběr v roce 1997), byl ke třem původním vzorkům z druhé skupiny přidán pro NAT testování pouze vzorek dárce V.K.

Další testování probíhalo v období od 23.2. do 10.3.2010 v sérologických laboratořích Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice (ÚKBLD VFN) pomocí následujících NAT metod:

- RT-PCR s hybridizací (kvalitativní metoda s kolorimetrickou detekcí pro stanovení HCV RNA, systém cobas Amplicor)
- Real Time qRT-PCR (kvantitativní metoda pro detekci HBV DNA s užitím fluorescence, systém cobas AmpliPrep/TaqMan)

Výsledky testování jsou shrnuty v následující tabulce a k dispozici též v příloze č.7.

Tabulka 27: Výsledky testování druhé skupiny vzorků NAT v ÚKBLD VFN⁹⁶

Vzorek dárce	L.L.	G.P.	M.J.	V.K.
Číslo odběru (archivní vzorek)	04724968	04714658	06402442	09500638
Datum odběru (archivní vzorek)	14.6.2004	23.6.2004	31.10.2006	26.3.2009
Výsledky testování (HCV-RNA NAT, kvalitativní metoda)	negativní	negativní	pozitivní	-
Výsledky testování (HBV-DNA NAT, kvantitativní metoda)	-	-	-	negativní

Archivní vzorek dárce M.J. byl vyhodnocen na systému cobas Amplicor jako **pozitivní**, **dárce byl tedy odebrán v diagnostickém okně.**

⁹⁶ Zdroj: Vlastní zpracování

Následný (tj. dotčený odběr dárce, ze kterého vycházel výběr předchozího/archivního vzorku) odběr dárce M.J. byl potvrzen v NRL pro virové hepatitidy jako HCV pozitivní. Na základě této skutečnosti byly transfuzní přípravky vyrobené z dotčených odběrů tohoto dárce ve FTO VFN zpětně vyhledány a zničeny v rámci standardních opatření a postupů daných jak legislativou České republiky, tak požadavky zpracovatelů plazmy (hlášení a postup look-back). Vzhledem k tomu, že dotčený dárce byl pravidelný dárce plazmy formou aferézy, byly zničeny plazmy uložené v karanténě ve FTO VFN i plazmy uložené v karanténě u zpracovatele plazmy (zpracovatel zničil plazmy na základě hlášení look-back).

8.4.2.4 Další vzorky

Již v době zpracovávání dat získaných během studie, konkrétně v období do konce roku, byl pozitivně potvrzen (HCV pozitivní) další opakovaný dárce – dárce Š.M. (č.odběru:10732821, datum odběru: 17.8.2010). Archivní vzorek z předchozího odběru od tohoto dárce (č.odběru: 10731786, datum odběru: 13.5.2010) byl zaslán do NRL pro virové hepatitidy ke konfirmačnímu vyšetření metodou NAT.

Vzorek tohoto dárce byl v NRL pro virové hepatitidy hodnocen jako negativní. Výsledky obou vyšetření z NRL pro virové hepatitidy (kopie *Protokolu o výsledcích laboratorních zkoušek*) je obsahem přílohy č.9.

V průběhu roku 2009 (25.března 2009) ohlásil zpracovatel plazmy (firma Baxter) FTO VFN **reaktivitu** vzorku (resp. poolu z osmi vzorků), zjištěnou během standardního HCV-RNA NAT testování (metoda HIV/HBV/HCV Blood Scening NAT), které zpracovatel provádí u všech vzorků plazem, které jsou dodány ke zpracování. Dalším testováním prováděným firmou Baxter bylo zjištěno, že se jedná o pozitivní vzorek provodárce K.S. (č.odběru: 08750066, datum odběru: 17.12.2008).

Archivní vzorek dárce z tohoto odběru byl pro další nezávislé potvrzení reaktivity testován v ÚKBLD VFN pomocí kvalitativní metody HCV-RNA NAT.

Vzorek tohoto dárce byl v ÚKBLD VFN hodnocen jako **pozitivní**. Dárce byl tedy odebrán v diagnostickém okně. Výsledek vyšetření v laboratořích FTO VFN metodou CMIA byl negativní.

Dárce K.S. byla jako prvodárce standardně odebrána plná krev – z tohoto odběru byly vyrobeny dva transfuzní přípravky – erytrocyty bez buffy-coatu resuspendované (EBR⁹⁷) a plazma (P).

Protože se ještě v roce 2009 vyšetřoval u dárců enzym ALT⁹⁸, byl na základě zvýšené hodnoty ALT ze vzorku dotčeného dárce K.S. (82,4 µkat/ml), vyrobený EBR zničen, plazma byla zaslána firmě Baxter ke zpracování. Souhrn všech výsledků testování vzorků druhé skupiny a dalších vzorků testovaných pomocí NAT na různých systémech je uveden v tabulce č.28.

Tabulka 28: Souhrnná tabulka testování druhé skupiny vzorků⁹⁹

Vzorek dárce	L.L.	G.P.	M.J.	V.K.	Š.M.	K.S.
Typ dárce	OD	OD	OD	OD	OD	PD
Číslo odběru (archivní vzorek)	0472496 8	0471465 8	06402442	0950063 8	1073178 6	08750066
Datum odběru (archivní vzorek)	14.6.200 4	23.6.200 4	31.10.200 6	26.3.200 9	13.5.201 0	17.12.200 8
Přehled výsledků testování jednotlivými metodami						
CMIA (Architect i2000, FTO VFN)	negativní	negativní	negativní	negativní	negativní	negativní
Taq Screen MPX (cobas s201, FTO VFN)	invalid	invalid	invalid	invalid	-	-
HCV-RNA NAT (cobas AmpliCor, ÚKBLD VFN)	negativní	negativní	pozitivní	-	-	pozitivní
HBV-DNA NAT (cobas AmpliPrep/TaqMa n ÚKBLD VFN)	-	-	-	negativní	-	-
Serologie hepat. C/ HCV-RNA NAT*	-	-	-	-	negativní	-

Legenda:

PD – prvodárce

OD – opakovaný dárce

* metody použité v NRL pro virové hepatitidy

⁹⁷ Erytrocyty bez buffy-coatu resuspendované

⁹⁸ Alaninaminotransferáza

⁹⁹ Zdroj: Vlastní zpracování

8.4.2.5 Testování druhé skupiny vzorků - závěry

Národní referenční laboratoř pro virové hepatitidy konfirmovala v období od roku 2004 do konce roku 2010 jako pozitivní celkem 8 opakovaných dárců krve a krevních složek z registru FTO VFN. Šest z nich bylo konfirmováno jako HCV pozitivní, dva z nich jako HBV pozitivní.

Ze souboru výše uvedených osmi pozitivních opakovaných dárců byly v rámci studie vyšetřeny pomocí NAT na různých systémech a pracovištích u pěti z nich vzorky z předchozích odběrů, vzorky tří dárců již nebyly v archivu laboratoří FTO k dispozici.

Jeden z vyšetřovaného souboru vzorků (dárce M.J.) byl reaktivní při testování metodou HCV – RNA NAT v ÚKBLD VFN¹⁰⁰. V rámci rutinního testování metodou CMIA ve FTO VFN byl negativní.

Dárce M.J. byl tedy odebrán v diagnostickém okně.

Během období testování druhé skupiny vzorků a zpracovávání dat byl zpracovatelem plazmy (Baxter) FTO VFN nahlášen pozitivní výsledek testování HCV-RNA NAT. Jako pozitivní byl označen vzorek provodárce K.S., u kterého byl výsledek rutinního testování metodou CMIA ve FTO VFN negativní. Výsledek testování provedený zpracovatelem plazmy byl potvrzen při nezávislém testování provedeném v laboratořích ÚKBLD VFN.

Dárce K.S. byl tedy také odebrán v diagnostickém okně.

¹⁰⁰ Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice

8.5 Diskuse

Každoročně je na světě testováno více než 53 milionů odběrů pomocí NAT technologie, počet netestovaných odběrů však stále zůstává vysoký - přibližně 40% z 92 milionů odběrů se NAT technologií netestuje. Nejčastěji je prováděno vyšetření HCV RNA. Je také zřejmé, že implementace a následné rozšíření NAT technologie do standardního režimu vyšetřování infekčních markerů v transfuzní službě historicky kopíruje ekonomickou vyspělost jednotlivých regionů. Například krevní banky v USA začaly používat NAT jako doplňující vyšetření sérologických metod ve druhé polovině devadesátých let nejprve pro HIV a HCV, následně pak bylo testování rozšířeno ještě o HBV a WNV. V současnosti je pomocí NAT technologie vyšetřováno v USA 100% odběrů (HIV-1, HCV, WNV a HBV), většina je testována technologií TMA NAT.⁽⁶⁸⁾

V Evropě bylo od první implementace NAT technologie (Německo v roce 1997) testováno již více než 600 milionů odběrů s různým stupněm zachytu NAT-only pozitivních vzorků (HIV-1 0,90; HCV 2,24, HBV 15,2 na milion odběrů). Nejčastěji jsou pro NAT testování využívány systémy Roche, dále systémy Novartis/Chiron a v neposlední řadě systémy vlastní produkce („in house“) využívající komerčně dodávaná diagnostika⁽⁶⁹⁾, režim vyšetřování je pak nejčastěji postaven na vyšetřování vzorků v poolech („mini-pool NAT“, MP-NAT).

Režim vyšetřování infekčních markerů v dané zemi obvykle vychází z požadavků legislativy, z epidemiologické situace a event. dalších národních specifik jako je např. způsob financování zdravotnictví nebo nastavený systém řízení zařízení transfuzní služby. V regionu střední Evropy (Rumunsko, Bulharsko, Polsko, Kypr, Česká republika, Slovenská republika, Slovinsko a Maďarsko) je NAT technologie implementována pro testování infekčních markerů u dárců krve pouze ve Slovinsku a Polsku.

8.5.1 Epidemiologická situace v České republice ve vztahu k transfuzní službě

HIV

Dle údajů Státního zdravotního ústavu z roku 2011 se Česká republika stále řadí k zemím s nízkým výskytem HIV infekce, i když od roku 2003 dochází ke stabilnímu výraznému nárůstu HIV infekcí. V období od roku 2004 do roku 2010 stoupla incidence HIV v České republice z 0,7 (72 případů, 2004) na 1,7 (180 případů, 2010).

Pro srovnání - jako země s nejvyšší incidencí HIV v roce 2010 jsou uváděny: Estonsko (27,8), Litva (12,2), Belgie (11,0) a Velká Británie (10,7). Naopak jako země s nejnižší incidencí jsou uvedeny Rumunsko (0,7) a Slovensko (0,5)^(64,65,66,67).

Při screeningu dárců krve a krevních složek bylo kumulativně za období od roku 1985 do 30. 6. 2011 zachyceno v České republice 42 HIV pozitivních osob. V roce 2009 a 2010 byly zachyceny výrazně vyšší počty HIV pozitivních – viz. tab. č. 31. Zda se jedná o trvalý trend ukážou teprve údaje v příštích letech.

HCV

Prevalence chronické HCV infekce v běžné populaci České republiky zjištěné v sérologickém přehledu v roce 2001 byla 0,2%.⁽⁵³⁾

Pro srovnání - v roce 2010 byla incidence HCV v zemích EU/EEA 6,93 (nejsou ale známy údaje z Belgie, Francie, Lichtenštejnska a ze Španělska). Pro Českou republiku je uváděna v uvedeném období incidence 6,75^(64,65,66,67).

Nejvyšší výskyt HCV je dle údajů Státního zdravotního ústavu v současné době v běžné populaci České republiky nalézán ve věkových skupinách 20-24letých, 15-19letých a 25-34letých.

Ve srovnání se záchytem infekcí HBV a HIV u dárců krve a krevních složek je počet pozitivně potvrzených infekcí virem hepatitidou C jednoznačně nejvyšší – viz tab. č. 29. Významnou roli ve vztahu k transfuzní službě hraje skutečnost, že cílovou skupinou v rámci náboru nových dárců krve jsou zejména mladí lidé a také fakt délky diagnostického okna při testování infekce virem hepatitidy C serologickými metodami.

Z obou skutečností je zřejmé, že riziko přenosu infekce virem hepatitidy C transfuzí je při zachování nastavených algoritmů v rámci sledovaných infekcí u dárců krve v České republice jednoznačně nejvyšší.

HBV

Dle údajů Státního zdravotního ústavu incidence akutní infekce HBV v České republice trvale klesá od 80. let minulého století. Po roce 2000 je nejvyšší výskyt infekce virem hepatitidy B ve věkových skupinách od 15 do 34 let. Očekává se, že plošné očkování jednoletých a dvanáctiletých (od roku 2001) mohlo významně pozitivně ovlivnit výskyt HBV infekce, což je pozitivní i ve vztahu k transfuzní službě, t.j. zejména k riziku přenosu infekce virem hepatitidy B transfuzí, a také k již výše zmiňovanému náboru mladých lidí do registru dárců krve a krevních složek. Prevalence chronické HBV infekce v běžné populaci zjištěné v sérologickém přehledu v roce 2001 byla 0,56%.⁽⁵³⁾

Incidence akutní hepatitidy B se v roce 2010 v zemích EU/EEA pohybovala v rozmezí od 0,13 ve Francii do 2,32 v České republice. Avšak údaje týkající se chronické hepatitidy B se značně liší. Zpráva uvádí incidenci v rozmezí od 1,71 pro Slovinsko až po 15,19 v Norsku.^(64,65,66,67)

8.5.2 Záchyt infekcí u dárců krve v České republice

V následujících tabulkách je uveden počet pozitivně potvrzených dárců v České republice od roku 2004 do roku 2010, resp. z těchto údajů vycházející průměrný počet pozitivně potvrzených dárců ročně. Opět upozorňuji na skutečnost, že údaje o dárcích ve vztahu ke sledovaným infekcím (tj. možný odběr v diagnostickém okně), kteří darovali krev nebo krevní složky pouze jednou, k dispozici nejsou.

Tabulka 29: Údaje o pozitivně potvrzených dárcích v ČR v období 2004-2010¹⁰¹

Rok	HBV (celkem/prvodárci)	HCV (celkem/prvodárci)	HIV (celkem/prvodárci)
2004	75/24	134/63	2/1
2005	51/21	98/42	2/0
2006	16/9	42/29	2/1
2007	30/19	34/29	3/1
2008	35/27	80/63	2/1
2009	45/36	142/126	6/4
2010	45/37	98/79	11/5

¹⁰¹ Zdroj: vlastní zpracování dle údajů ÚZIS

Tabulka 30: Průměrný počet pozitivně confirmovaných dárců v ČR za kalendářní rok¹⁰²

	HBV (celkem/prvodárci)	HCV (celkem/prvodárci)	HIV (celkem/prvodárci)
Průměrný počet pozitivních confirmací	42/25	90/62	4/2

Zvýrazněné údaje v tabulce č.29 poukazují na negativní vliv nových zařízení transfuzní služby na počty pozitivně confirmovaných dárců, zejména prvodárců, v České republice. V průběhu roku 2008 zahájila svou činnost nová zařízení transfuzní služby, která platí dárcům za každý odběr plazmy formou aferézy. Tato skutečnost negativně ovlivnila záchyt infekcí sledovaných u dárců krve. K největšímu nárůstu pozitivně confirmovaných infekcí došlo obecně u prvodárců, co se týče infekcí pak u infekce virem hepatitidy typu C, jak je vidět také v následující tabulce.

Tabulka 31: Vliv plasmaferetických center na počty confirmovaných¹⁰³

Rok	HBV (op. dárci/prvodárci)	HCV (op. dárci/prvodárci)	HIV (op. dárci/prvodárci)
2004	10,3 / 81,9	14,3 / 215,0	0,2 / 3,4
2005	5,7 / 66,3	10,7 / 132,5	0,4 / 0
2006	1,5 / 39,3	2,8 / 126,6	0,2 / 4,4
2007	2,5 / 37,9	1,1 / 57,8	0,5 / 2,0
2008	1,2 / 49,5	2,5 / 115,6	0,2 / 1,8
2009	1,0 / 56,4	1,8 / 197,5	0,2 / 6,3
2010	0,8 / 63,8	1,8 / 136,2	0,6 / 8,6

Legenda:

V tabulce jsou uvedeny počty pozitivně confirmovaných, které jsou vždy vztaženy na 100 000 vyšetřených vzorků opakovaných dárců a prvodárců. U prvodárců hodnota zároveň vyjadřuje prevalenci (tj. počet pozitivně confirmovaných prvodárců na 100 000 vyšetřených prvodárců), naopak incidenci u opakovaných a pravidelných dárců (tj. počet pozitivně confirmovaných opakovaných dárců a pravidelných dárců na 100 000 vyšetřených opakovaných a pravidelných dárců) není uvedena – v ÚZIS jsou k dispozici pouze data od roku 2008.

¹⁰² Zdroj: vlastní zpracování dle údajů ÚZIS z let 2004-2010

¹⁰³ Zdroj: vlastní zpracování dle údajů ÚZIS

8.5.3 Riziko přenosu infekce transfuzí v České republice

V České republice je průměrně ročně podáno 400 000 T.U. koncentrátů erytrocytů, 34 000 terapeutických dávek koncentrátů trombocytů a 190 000 T.U. plazmy.⁽⁴²⁾

Spektrum povinně vyšetřovaných markerů infekcí sledovaných u dárců krve stanovuje Vyhláška o lidské krvi v platném znění, která také stanovuje nepodkročitelná minima způsobu testování sledovaných infekčních markerů.

Díky tomu a dalším opatřením, jako je např. udržování národního registru trvale vyřazených dárců a hlášení a sledování nežádoucích reakcí po transfuzi, lze odhadovat pravděpodobnost rizika přenosu infekce transfuzí pro HBV nebo HCV na 1:250 až 300 000 podaných transfuzí a pro HIV 1 až 2:5 milionů podaných transfuzí⁽¹³⁾.

Za předpokladu, že z jednoho dárcovského odběru jsou vyrobeny 1-2 transfuzní přípravky (plná krev = erytrocyty a plazma), pohybuje se odhadované riziko přenosu infekce transfuzí v České republice takto: 7 přenosů HCV na 1 milion odběrů, 6 přenosů HBV na milion odběrů a mezi 0,4 – 0,7 přenosů HIV na milion odběrů. V porovnání s ostatními státy před a po NAT implementaci je Česká republika zemí s nízkým rizikem přenosu HIV infekce transfuzí (nejnižší odhadované riziko přenosu HIV po NAT implementaci je 0,18 v Německu, nejvyšší je 1,1 v Itálii), stále však zůstáváme evropskou zemí s vysokým rizikem přenosu infekce HCV transfuzí (nejvyšší odhadované riziko přenosu HCV před NAT implementací mělo s 3,94 přenosy na milion odběrů Španělsko)⁽⁷⁰⁾

K zemím s nejbezpečnější hemoterapií na světě z hlediska přenosu virové infekce (přenos HIV, HBV, HCV, HTLV 1 a 2) je řazena Austrálie, kde se udává odhadované riziko přenosu sledovaných virových infekcí transfuzí méně než 1:1 milion podaných transfuzí ročně⁽⁶⁰⁾.

Na základě výše uvedených údajů jsou tedy v České republice vystaveni odhadovanému riziku podání transfuzního přípravku kontaminovaného virem hepatitidy B nebo C dva příjemci ročně. Pravděpodobnost podání transfuzního přípravku kontaminovaného virem HIV je asi dvacetinásobně nižší.

8.5.4 Souhrn výsledků testování infekčních markerů u dárců krve ve FTO VFN

Testování vzorků v první skupině (cobas TaqScreen MPX) bylo uzavřeno s výsledkem negativní, ve druhé skupině byl zjištěn *jeden dárcce, který byl prokazatelně odebrán v diagnostickém okně (HCV pozitivní)*.

Pro doplnění uvádím také hlášeného prvodárce (hlášeno zpracovatelem plazmy), který byl také odebrán v diagnostickém okně standardně používaných serologických testů.

Zaměříme-li se z dlouhodobého hlediska na počet potvrzených dárců a prvodárců, zjistíme, že ve FTO VFN připadá na každých cca 430 odběrů prvodárců jeden pozitivně potvrzený prvodárce na některou ze sledovaných infekcí, u opakovaných dárců je to jeden potvrzený dárcce na cca 28 000 odběrů (viz následující tabulky).

Tabulka 32: Údaje o prvodárcích ve FTO VFN v období 2004-2010¹⁰⁴

Počet prvodárců	Počet prvodárců, kteří absolvovali pouze jeden odběr	Počet pozitivně potvrzených odběrů CMIA opak. reak., potvrzení NRL (HBV, HIV, HCV)	Počet prvodárců v diagnostickém okně
13 000	5 000	30	1+?

Počet prvodárců odebraných v diagnostickém okně v tomto období (1 hlášený prvodárce na cca 13 tisíc odebraných prvodárců) není přesně znám – 38% prvodárců daruje svou krev pouze jednou a zařízení transfuzní služby tedy nemají možnost zjistit jakékoli další údaje v souvislosti s testováním sledovaných infekcí.

¹⁰⁴ Zdroj: databáze FTO VFN, vlastní zpracování

Zjištěné riziko odběru opakovaného dárce v diagnostickém okně je jeden opakovaný dárce na cca 220 tisíc odběrů. Toto riziko řádově odpovídá odhadovanému riziku podání kontaminovaného transfuzního přípravku v České republice (viz dále).

Tabulka 33: Údaje o opakovaných dárčích ve FTO VFN v období 2004-2010¹⁰⁵

Počet vzorků opakovaných dárců	Počet pozitivně confirmovaných odběrů CMIA opak. reak., confirmace v NRL (HBV, HCV, HIV)	Počet opakovaných dárců odebraných v diagnostickém okně (CMIA neg., NAT reaktivní)
220 000	8	1

Z výše uvedeného je zřejmé, že nositelem jednoznačně nejvyššího rizika přenou infekce transfuzí je prvodárce, který daruje krev pouze jedenkrát. K obdobným závěrům došli ve své práci i Zou, S., Fang, C., T., a Doss, Ry. ⁽⁷¹⁾. Nejvyšší riziko přenosu infekce transfuzí je u sledovaných infekcí spojeno s HCV. Výsledky testování také potvrzují předpoklad, že zavedení NAT pro testování infekčních markerů u dárců krve a krevních složek vede ke zkrácení diagnostického okna u sledovaných infekcí a tedy snižuje riziko přenosu sledovaných infekcí transfuzí.

Dalším, neméně důležitým cílem studie, bylo posoudit i praktické aspekty vyšetřování infekčních markerů u dárců krve a krevních složek oběma metodami (serologické a NAT). Naše zkušenost ukázala, že je nutno vzhledem ke cost&benefit přizpůsobit režim vyšetřování infekčních markerů metodou RT-Real Time PCR počtu vyšetřovaných vzorků (shromažďovat vzorky a následně je vyšetřovat v sériích). Nároky na počet pracovníků se zavedením metody RT-Real Time PCR na našem pracovišti nezvýšily, což nelze říci o nákladech na vlastní testování. Pokud by metoda RT-Real Time PCR doplnila stávající metodu CMIA, mohly by náklady na vyšetření stoupnout až na dvojnásobek (údaj je vztažen k možným cenám v době probíhající studie – detaily viz kapitola 8.5.6.

¹⁰⁵ Zdroj: databáze FTO VFN, vlastní zpracování

8.5.5 Náklady na léčbu pacienta s hepatitidou B, hepatitidou C a s infekcí virem HIV

Jak již bylo uvedeno výše, jsou v České republice ročně ohroženi infekcí virem hepatitidy B nebo C přibližně dva příjemci transfuzního přípravku. Náklady na léčbu pacientů léčených pro infekci hepatitidou B nebo C se pohybují v řádech statisíců CZK.

Celkové náklady na léčbu hepatitidy C se pohybují ve výši 300 000 CZK⁽⁴³⁾ (pouze náklady na léčebné látky, konkrétně se údaje týkají nákladů na léčbu pegylovanými interferony).

Celkové náklady na léčbu hepatitidy B se pohybují ve výši 400 000 CZK⁽⁴⁴⁾ (pouze náklady na léčebné látky, konkrétně se údaje týkají nákladů na léčbu pegylovanými interferony). Riziko podání transfuzního přípravku kontaminovaného virem HIV je pro příjemce asi 20x nižší než je riziko uváděné pro viry hepatitid B a C. Náklady na léčbu jedince infikovaného virem HIV ale rozhodně nižší nejsou.

Náklady na léčbu HIV pozitivních pacientů se pohybují od 10 000 -15 000 USD⁽⁴⁵⁾/pacienta/rok (pouze náklady na léčebné látky, konkrétně se údaje týkají léčby trojkombinací nukleosidových analogů a inhibitorů proteáz). Očekávaná doba léčení (přežití) se pohybuje v intervalu 8-10 let, ale může dosáhnout až doby 24 let.

8.5.6 Odhad nákladů na testování infekčních markerů (HBV, HCV, HIV) u dárců krve metodou NAT v České republice

Základní kalkulace nákladů na testování infekčních markerů (HBV, HCV, HIV) u dárců krve metodou NAT v České republice ukazuje tabulka č.34.

Tabulka 34: Základní kalkulace nákladů (diagnostika) na testování infekčních markerů (HBV, HCV, HIV) u dárců krve metodou NAT v České Republice¹⁰⁶

Průměrný počet vyšetřených odběrů/rok		Cena za 1 vyšetření NAT (HBV+ HCV+ HIV)		
		5 €	8 €	10 €
Prvodárci	34 500	4,4 mil. CZK	7,0 mil. CZK	8,8 mil. CZK
Odběry celkem	538 700	68,7 mil. CZK	109,9 mil. CZK	137,4 mil. CZK

O částky uvedené v tabulce č.34 by se v České republice ročně navýšily náklady na diagnostika (nejsou zohledněny náklady na mzdy, zkumavky, dopravu apod., takže náklady by byly pravděpodobně vyšší) v rámci testování infekčních markerů, pokud by stávající algoritmus testování daný legislativou byl rozšířen o metodu NAT. Zdrojem údajů o počtu vyšetřených prvodárců a odběrů celkem jsou data ÚZIS¹⁰⁷.

Uvedené možnosti cen za vyšetření infekčních markerů jednoho odběru metodou NAT jsou odhadnuté na základě informací dodavatelů testovacích systémů a diagnostik v České republice v době, kdy tato studie probíhala. Pro srovnání: ceny za jedno vyšetření metodou NAT u dárců krve se v Německu pohybují v řádech desítek eurocentů a v USA¹⁰⁸ v řádech desítek dolarcentů¹⁰⁹.

¹⁰⁶ Zdroj: vlastní zpracování, data ÚZIS

¹⁰⁷ Ústav zdravotnických informací a statistiky

¹⁰⁸ Spojené státy americké

¹⁰⁹ Zdroj: 13. pracovní dny v transfuzním lékařství (6. – 8.10.2011)

8.6 Závěr

1. Vyšetřování infekčních markerů (HBV, HCV, HIV) u dárců krve a krevních složek metodou CMIA doplněnou o NAT snižuje riziko přenosu infekce transfuzí. Nadále však přetrvává riziko přenosu okultní infekce virem hepatitidy B u HBV DNA negativních dárců krve a krevních složek. Rozšířením screeningu o vyšetření protilátek anti-HBc je možné toto riziko snížit.
2. Prvodárci jsou nositeli vyššího rizika přenosu infekce transfuzí než opakovaní dárce.
3. V České republice jsou příjemci transfuzí nejvíce ohroženi infekcí virem hepatitidy C. Implementace vyšetřování HCV RNA v rámci screeningu dárců krve a krevních složek může zkrátit odhadované serologické diagnostické okno téměř čtyřikrát.
4. Rozhodování o mandatorním zavedení testování virových markerů u dárců krve v České republice metodou NAT by mělo vycházet z aktuální prevalence sledovaných virových infekcí u dárců krve a z údajů o počtu dárců odebraných v diagnostickém okně, protože cost&benefit testování dárců krve metodou NAT je takový, jaká je epidemiologická situace v zemi a jaké je reálné riziko přenosu infekce transfuzí. Počet dárců odebraných v diagnostickém okně je významným ukazatelem rizika přenosu infekce transfuzí. Ve vztahu k očekávaným zvýšeným nákladům na testování infekčních markerů u dárců krve metodou NAT je třeba vzít v úvahu i výši dalších možných nákladů – výloh k soudním řízením (až milionové částky vyplácené po mnoho let), které by mohlo zaplatit zdravotnické zařízení po podání transfuzního přípravku kontaminovaného některým ze sledovaných virů. Argumentem žalující strany by jistě byl fakt, že ačkoli jsou k dispozici citlivější metody pro záchyt sledovaných infekcí, nejsou v zařízeních transfuzní služby zavedeny. I tato úvaha je argumentem pro zařazení testování infekčních markerů u dárců krve metodou NAT do rutinního screeningu.
5. Pro získání přesných údajů o počtu dárců odebraných v diagnostickém okně je nutná dohoda mezi ZTS¹¹⁰ v České republice a NRL pro virové hepatitidy a NRL pro AIDS o povinném zasílání archivních vzorků z předchozích odběrů u pozitivně potvrzených opakovaných dárců ke konfirmačním vyšetřením do

¹¹⁰ Zařízení transfuzní služby

NRL pro virové hepatitidy a NRL pro AIDS. Pro další získání validní informace k rozhodování o zavedení NAT testování virových markerů u dárců krve lze tuto dohodu rozšířit i o zasílání vzorků prvodárců, kteří byli v rámci testování screeningovými metodami stanovenými Vyhláškou o lidské krvi v platném znění negativní.

6. V rámci následného rozhodování o algoritmu testování dárců krve metodou NAT, které by vycházelo z reálných počtů dárců odebraných v diagnostickém okně, by mělo být stanoveno (spolupráce STL ČLS JEP¹¹¹, SZÚ¹¹², MZČR¹¹³, ZP¹¹⁴) zda NAT metodami testovat pouze prvodárce (náklady na testování by byly nižší, ale trvalo by riziko odběru v diagnostickém okně u opakovaných dárců) nebo všechny dárce bez výběru (tento výběr by podstatně snížil riziko přenosu infekce, ale přinesl by významně vyšší náklady na testování) nebo pouze odběry krevních složek, které neprocházejí karanténou (nevhodné z hlediska náročnosti logistiky přípravy vzorků).
7. V případě kladného rozhodnutí o rozšíření testování virových markerů o NAT stanovit, zda testovat „pouze“ markery HBV, HCV a HIV nebo spektrum rozšířit o vyšetřování dalších sledovaných virů, t.j. o Parvovirus B 19, na který jsou běžně testovány odběry plazmy určené k dalšímu zpracování ve frakcionačních zařízeních. Nebo i o West Nile Virus, který je v některých zemích sezónně zařazován do screeningu infekčních markerů dárců krve.
8. Pokud by bylo rozhodnutí o testování infekčních markerů u dárců krve metodou NAT kladné, bylo by vhodné vzhledem k značným očekávaným nákladům pro ZTS v ČR¹¹⁵ vyšetření centralizovat do několika velkých ZTS.
9. Alternativní cestou vedoucí ke snížení rizika přenosu infekce transfuzí by mohla být výroba patogen-inaktivovaných transfuzních přípravků. Její zásadní nevýhodou je však skutečnost, že v současné době lze inaktivovat patogeny pouze v plazmě nebo v koncentrátech trombocytů.
10. V souvislosti se snahou snižovat riziko přenosu infekce transfuzí, je zde i možnost využití tzv. autologních transfuzí, ačkoli podání autologních transfuzí

¹¹¹ Společnost pro transfuzní lékařství České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně

¹¹² Státní zdravotní ústav

¹¹³ Ministerstvo zdravotnictví České republiky

¹¹⁴ Zdravotní pojišťovny

¹¹⁵ Česká republika

má svá omezení a ne každý pacient, který potřebuje transfuzi, je vhodným kandidátem k autolognímu odběru.

11. Snaha snížit riziko přenosu infekce transfuzí by z pohledu obecné bezpečnosti transfuze měla být součástí komplexu opatření, která začínají již edukací potenciálních dárců krve o rizicích souvisejících s dárcovstvím. Dárci krve by měli být seznámeni i s těmi riziky, které přináší transfuze pacientovi (zejména z pohledu přenosu infekce), i s důvody, proč někteří jedinci nemohou být akceptováni jako dárci krve. Z pohledu bezpečnosti transfuze je důležitý výběr dárců krve, zpracování odebrané plné krve nebo jejích složek tak, aby se snížilo riziko sekundární kontaminace patogeny a snížilo riziko potransfuzních nežádoucích reakcí a komplikací. Riziko přenosu infekce způsobené tzv. intracelulárními viry (např. CMV) významně snižuje hemoterapie deleukotizovanými transfuzními přípravky. Protože léčba deleukotizovanými transfuzními přípravky prokazatelně snižuje i výskyt pyretických reakcí po transfuzi, měla by být zlatým standardem účelné hemoterapie v České republice. V neposlední řadě je třeba nastavit takový algoritmus vyšetřování infekčních markerů, aby bylo riziko přenosu infekce závažných sledovaných infekcí co nejnižší.
12. Protože riziko přenosu infekce transfuzí existuje, stejně jako existuje riziko dalších závažných potransfuzních reakcí a komplikací, je třeba nastavit takové algoritmy rozhodování o podání transfuze (v současné době nejsou k dispozici obecně akceptované standardy a doporučení týkající se podání transfuzních přípravků, indikační kritéria se řídí osobní zkušeností nebo dokonce jen místními zvyklostmi), aby léčba transfuzními přípravky byla hemoterapií skutečně účelnou. Nastavení indikačních kritérií vyžaduje úzkou spolupráci STL ČLS JEP a dalších odborných lékařských společností.
13. Všechny závažné nežádoucí reakce a komplikace, tedy i podezření na přenos infekce transfuzí nebo prokázaný přenos infekce transfuzí, by měly být hlášeny krevní bance a ve spolupráci s krevní bankou i do SÚKL¹¹⁶. Řádně hlášené nežádoucí reakce a komplikace mohou významným způsobem ovlivnit rozhodování o spektru vyráběných transfuzních přípravků, způsobu jejich výroby a v neposlední řadě i o algoritmu vyšetření infekčních markerů

¹¹⁶ Státní ústav pro kontrolu léčiv

sledovaných infekcí. V současné době se sice hlásí do SZÚ nově zjištěná onemocnění hepatitidami, ale hlášení mají takový charakter, že není zřejmé, zda onemocnění mohlo vzniknout v souvislosti s podanou transfuzí (dle informace NRC¹¹⁷ pro analýzu epidemiologických dat v ČR je ve formuláři hlášení uvedena pouze informace, zda má pacient v anamnéze transfuzi či nikoli a to bez bližšího časového údaje, ze kterého by bylo možno usuzovat na souvislost transfuze s onemocněním hepatitidou).

Povinnost hlásit státním autoritám nově zjištěná sledovaná infekční onemocnění je v České republice stanovena legislativou. Na druhou stranu ZTS, která mají povinnost zajistit co nejvyšší bezpečnost transfuzních přípravků, mnohdy postrádají zpětnou informaci od státních autorit o záchytech infekcí. Informace o záchytech závažných sledovaných infekcí (HBV, HCV, HIV) je jedním z kroků zajištění bezpečnosti transfuze z hlediska přenosu infekce (porovnání hlášení proti registru dárců krve a krevních složek). Některá ZTS dostávají měsíční informace o záchytech hepatitid z Hygienických stanic dle regionu, ale hlášení o záchytech HIV pozitivních jedinců nejsou pro ZTS k dispozici. V rámci opatření vedoucích ke zvýšení bezpečnosti transfuze z hlediska přenosu infekce transfuzí je třeba zajistit, aby ZTS měla k dispozici informace o záchytech závažných sledovaných infekcí a o aktuální epidemiologické situaci související s exotickými cestovatelskými infekcemi.

14. Dárce krve nebo krevních složek nesmí být ohrožen odběrem samotným a pokud je pozitivně potvrzen v souvislosti s některou sledovanou závažnou infekcí, je třeba zajistit, aby byl o této skutečnosti neodkladně informován, řádně dispenzarizován a léčen.
15. Zabezpečení bezpečnosti transfuze nejen z pohledu rizika přenosu infekce transfuzí je nepochybně záležitostí mezioborové spolupráce, ale i spolupráce ZTS se státními autoritami a v neposlední řadě i spolupráce s Českým červeným křížem (edukace a nábor dárců). Hovoříme – li o bezpečnosti transfuze z hlediska přenosu infekce, je zavedení NAT testování infekčních markerů u dárců krve nepochybným přínosem, ale očekávané zvýšené náklady na testování přesouvají konečné rozhodnutí o jeho zavedení spíše do oblasti rozhodnutí politických než do oblasti rozhodnutí odborných lékařských společností.

¹¹⁷ Národní referenční centrum

Seznam použité literatury a pramenů

1. KILDUFEE, R. A., DEBAKEY, M. *History*. In: *The Blood Bank and the Technique and Therapeutics of Transfusion*. St. Louis C. V. Mosby Company, 1942, p. 17-39.
2. WISE, W. M., O'LEARY, J. P. *The Origins of Blood Transfusion: Early History*. *The American Surgeon*, January 2002, Vol. 58, p.98-100.
3. DeGOWIN, E. L. *The A-B-O Blood Groups*. In: DeGOWIN, E. L. , HARDIN, R. C. , ALSEVER, J. B. In: *Blood Transfusion*, W. B. Saunders Company, Philadelphia London 1949, p. 52-64.
4. DUINOVÁ, N., SUTCLIFFOVÁ, J. *Landsteiner a krevní skupiny*. In: *Historie medicíny*, Slovart, 1997, s. 92-93.
5. GIANGRANDE, P. L. F. *The history of blood transfusion*. *British Journal of Haematology*, 2000, 110, p. 758-767.
6. CODNER, P. , CINAT, M. *Massive Transfusion for Trauma is Appropriate*. *Trauma Care*, Summer 2005, vol. 15, no.3, p. 148-152.
7. DOBRÝ, E. *Historie krevní transfúze*. In: HRUBIŠKO, M., DOBRÝ E. *Základy hemoterapie*. Vydavatelství Osveta, 1974, s. 9-17.
8. JEDLIČKOVÁ, J. *K dějinám transfuzní služby v Brně- přednáška*, 2005.
9. GALUSZKOVÁ, D. *Klinické aspekty aplikace vybraných krevních přípravků v podmínkách Fakultní nemocnice Olomouc*. Dizertační práce, Lékařská fakulta Univerzity Palackého Olomouc, 2008. 134s. Vedoucí práce: prof. MUDr. Ivo Krč, Dr.Sc., s.18-29.
10. *Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components 14*. Edom (European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care), 2008.
11. Vyhláška 351/2010 ze dne 2.12.2010, kterou se mění vyhláška č. 143/2008 Sb., o stanovení bližších požadavků pro zajištění jakosti a bezpečnosti lidské krve a jejích složek (vyhláška o lidské krvi).

12. SPOLEČNOST PRO TRANSFUZNÍ LÉKAŘSTVÍ, *Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2007_03 verze 4 ze dne 1. 3. 2011 (2011_03)* [online]. c2005, 1.3.2011 [cit. 15.3.2011]. Dostupné z <http://www.transfuznispolecnost.cz/doc/postupy/Dop_STL2007_03_Zpusobilost_darce_V4_2011_03_01.doc>
13. TUREK, P. *Vyšetřování infekčních markerů v transfuzní službě*. Transfuze a hematologie dnes, září 2009, s.17-19.
14. McCULLOUGH, J. *Transfusion Medicine*. Elsevier, 2005, p.163-439.
15. KITCHEN, A. D., BARBARA, J. A. J. *Transfusion –transmitted infections*. In: MURPHY, M. F., PAMPHILON, D. H. *Practical Transfusion Medicine*. Blackwell Science, 2001, p. 192-210.
16. BSE INFO – vCJD TRANSMISSION, *vCJD Transmission* [online]. c2012, [cit. 10.3.2011]. Dostupné z <<http://www.bseinfo.org/vcjdtransmission.aspx>>
17. HUSA, P. *Virové hepatitidy*. Galén, 2005, s. 19-74.
18. BENEŠ, J. *C1-Virové infekce*. In: BENEŠ, J., et al. *Infekční lékařství*. Galén, 2009, s.122-191.
19. FRAŇKOVÁ, V., *Virologie*. In: BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J. *Lékařská mikrobiologie*, Marvil, 1996, s. 367-482.
20. *Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components 15*. Edom (European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care), 2009.
21. BENEŠ, J. *C2-Bakteriální infekce*. In: BENEŠ, J., et al. *Infekční lékařství*. Galén, 2009, s. 197-309.
22. JOHN, C., SOUČEK, A., SCHINDLER, J. *Gramnegativní aerobní tyčky*. In: BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J. *Lékařská mikrobiologie*, Marvil, 1996, s. 246-260.
23. JOHN, C., SOUČEK, A. *Gramnegativní fakultativně anaerobní tyčky*. In: BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J. *Lékařská mikrobiologie*, Marvil, 1996, s. 261-283.

24. SOUČKOVÁ, A. *Spirochety*. In: BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J. *Lékařská mikrobiologie*, Marvil, 1996, s. 185-192.
25. STEJSKAL, F., VANIŠTA, J., *C4-Parazitární infekce*. In: BENEŠ, J., et al. *Infekční lékařství*. Galén, 2009, s. 320-371. :-)
26. NOHÝNKOVÁ, E., VÁVRA, J. *Protozoa*. In: BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J. *Lékařská mikrobiologie*, Marvil, 1996, s. 488-502.
27. CHALUPA, P., *C5-Prionové choroby*. In: BENEŠ, J., et al. *Infekční lékařství*. Galén, 2009, s. 371-376.
28. LOBOVSKÁ, A., HOLUB, M. *Laboratorní diagnostika infekčních nemocí*. In: ZIMA, T., et al. *Laboratorní diagnostika*, Galén, 2007, s. 639-649.
29. BEDNÁŘ, M., SOUČEK, A., VÁVRA, J., et al. *Lékařská a speciální mikrobiologie a parazitologie*. Marvil, 1994.
30. HAVLÍK, J., et al. *Infekční nemoci*. Galén, 1998.
31. KLENER, P., et al. *Vnitřní lékařství*. Galén-Univerzita Karlova, 2001.
32. LOBOVSKÁ, A. *Infekční nemoci*. Univerzita Karlova, 2001.
33. ŠERÝ, V., BÁLINT, O., et al. *Tropická a cestovní medicína*. Medon, 1998.
34. PRŮŠA, R., MACEK ml., M. *Molekulární diagnostika*. In: ZIMA, T., et al. *Laboratorní diagnostika*, Galén, 2007, s. 681-699.
35. BOHONĚK, M. *Přehled testů a technologie sérologického vyšetřování infekčních markerů u dárců krve v ČR*. Přednáška. 4. Střešovický transfuzní den, 4.11.2010, Praha.
36. KÁŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. *Laboratorní techniky biochemie*. VŠCHT Praha, 2006, s. 38-47.
37. PUB MED.GOV, *Hepatitis B virus nucleic acid testing in Chinese blood donors with normal and elevated alanine aminotransferase* [online]. c2011, [cit. 20.4.2011]. Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21682731>>

38. WILEY ONLINE LIBRARY, *Hepatitis B virus nucleic acid testing in Chinese blood donors with normal and elevated alanine aminotransferase* [online].c1999-2012. Dostupné z <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1537-995.2011.03215.x/abstract>>
39. JAPANESE RED CROSS SOCIETY, *Blood Programme, Safety Measures Concerning Blood* [online].c2008, [cit. 20.4.2011].Dostupné z <<http://www.jrc.or.jp/english/activity/blood.html>>
40. AUSTRALIAN RED CROSS BLOOD SERVICE, [online].c2010, [cit.20.4.2011].Dostupné z <<http://www.donateblood.com./all-about-blood/safety-and-testing>>
42. sp.zn.sukls143610/2010, *Revize podmínek úhrad 2009, Podskupina 12 a 15 – individuálně vyráběné léčivé přípravky.*
43. OBČANSKÉ SDRUŽENÍ PREVENT, *7 důvodů, proč podpořit Prevent*, [online], [cit.12.5.2011]. Dostupné z <<http://www.os-prevent.cz/7-zajimavych-duvodu-proc-podporit-prevent>>
44. ZDRAVOTNICKÉ NOVINY, *Pegasys-optimální léčba chronické hepatitidy B* [online].c2007-2012, [cit. 22.5.2011]. Dostupné z <<http://www.zdn.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/pegasys-optimalni-lecba-chronicke-hepatitidy-b-172382>>
45. OBČANSKÉ SDRUŽENÍ PREVENT, *Prevent bojuje proti šíření HIV a jiných infekčních nemocí*, [online].c2010, [cit.22.5.2011]. Dostupné z <<http://www.os-prevent.cz/aktuality/preventbojujeprotisirenihivajinychinfekcnichnemoci>>
46. TESAŘOVÁ, E. *Limity deleukotizace*. XI. Pracovní dny Společnosti pro transfuzní lékařství, Brno 25.-27.9. 2005.
47. ZUPANSKA, B., UHRYNOVSKA, M., MICHUR, H., MASLANKA, K., ZAJKO, M. *Transfusion-related acute lung injury and leucocyte-reacting antibodies*. *Vox Sanguinis* (2007) 93:70-77.
48. *Zákon č. 378/2007Sb. o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů.*
49. *Serious Hazards of Transfusion (SHOT) Annual Report 2005*. Dostupné z <<http://www.shotuk.org/wp-content/uploads/2010/03/SHOT-report-2005.pdf>>

50. KUBISH, P. a kol. *Hematológia a transfuziologie, učebnica*. Grada Publishing, 2006.
51. BIHL, F., CASTELLI, D., MARINCOLA, F., DODD, R., BRANDER, CH. *Transfusion – transmitted infection*. Journal of Translational Medicine 2007;5, 25:1-11.
52. SACHAIS, B. S. *Bacterial Contamination of Blood Products*. In: HILLYER, C. D., HILLYER, K. L., STROBL, F. J., JEFFERIES, L. C., SILBERSTEIN, L. E. *Handbook of Transfusion Medicine*. Academic Press, 2001, p.307-310.
53. ZDRAVOTNICKÉ NOVINY, *Léčba chronických virových hepatitid B a C*, [online]. c2007-2012, [cit. 22.5.2011]. Dostupné z <<http://www.zdn.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/lecba-chronicky-ch-virovych-hepatitid-b-a-c>>
54. EPIDEMIOLOGIE AIDS-WIKISKRIPTA, *Epidemiologie AIDS*, [online]., [cit.28.5.2011]. Dostupné z <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Epidemiologie_AIDS>
55. ROČNÍ ZPRÁVY O VÝSKYTU A ŠÍŘENÍ HIV/AIDS V ČR, SZÚ, *Roční zprávy o výskytu a šíření HIV/AIDS v ČR*, [online].cStátní zdravotní ústav, [cit.28.5.2011]. Dostupné z <<http://www.szu.cz/tema/prevence/rocni-zpravy-o-vyskytu-a-sireni-hiv-aids-v-cr>>
56. COMANOR, L., HOLLAND, P. *Hepatitis B virus blood screening: unfinished agendas*. Vox Sanguinis 2006; 91, p. 1-12.
57. STRAMER, S., L. *Pooled HBV DNA testing by nucleic acid amplification: implementation or not*. Transfusion 2005; 42, p. 1242-6.
58. KLEINMAN, S., H., STRONG, D., M.,TEGTMEIER, G., G., HOLLAND, P., V.,GORLIN, J., B., COUSINS, C., R.,CHIACHERRINI, R., P., PIETRELLI, L.,A. *Hepatitis B virus (HBV) DNA screening of blood donations in minipools with the COBAS AmpliScreen HBV test*. Transfusion 2005;45, p. 1247-57.
59. KLEINMAN, S., BUSH, M. *Assessing the impact of HBV NAT on window period reduction and residual risk*. Journal of Clinical Virology 2006; 36, p. 23-29.

60. RESIDUAL RISK ESTIMATES FOR TRANSFUSION-TRANSMITTED INFECTIONS (AUSTRALIAN RED CROSS BLOOD SERVICE), *Residual Risk estimates for Transfusion-transmitted infections*, [online].c2011, [cit.30.5.2011]. Dostupné z <<http://www.transfusion.com.au/node/115>>
61. RUDMAN V. SALLY, *Textbook of blood banking and transfusion medicine, Second Edition*, Elsevier Saunders, 2005
62. INFORMACE-STATISTIKY, Informace-statistiky HIV/AIDS, [online]. c2007-2011, [cit.30.5.2011]. Dostupné z <http://www.aids-pomoc.cz/info_statistiky.htm>
63. NĚMEČEK, V., MALÝ, M., BENEŠ, Č. Trendy ve výskytu infekcí HIV, HCV a HBV v ČR. *Transfuze a hematologie dnes*, říjen 2011; s.24-25.
64. ANNUAL EPIDEMIOLOGICAL REPORT REPORTING ON 2009 SURVEILLANCE DATA AND 2010 EPIDEMIC INTELLIGENCE DATA (report) - *European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe*, ISBN: 978-92-9193-321-1, [online]. c2012, [cit. 10.8.2012], available from <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1111_SUR_Annual_Epidemiological_Report_on_Communicable_Diseases_in_Europe.pdf>
65. ANNUAL EPIDEMIOLOGICAL REPORT REPORTING ON 2010 SURVEILLANCE DATA AND 2011 EPIDEMIC INTELLIGENCE DATA (report) - *European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe*, [online]. c2005-2013, [cit. 10.11.2013], available from <<http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Annual-Epidemiological-Report-2012.pdf>>

66. HEPATITIS B AND C IN THE EU NEIGHBOURHOOD: PREVALENCE, BURDEN OF DISEASE AND SCREENING POLICIES (report) - *European centre for disease prevention and control/WHO Regional Office for Europe*, ISBN: 978-92-9193-213-9, [online]. c2012, [cit. 10.8.2012], available from <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/TER_100914_Hep_B_C%20_EU_neighbourhood.pdf>
67. HIV/AIDS SURVEILLANCE IN EUROPE 2010 (report) - *European centre for disease prevention and control/WHO Regional Office for Europe*, ISBN: 978-92-9193-324-2, [online]. c2012, [cit. 10.9.2012], available from <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/111129_SUR_Annual_HIV_Report.pdf>
68. STROBL, F.; *NAT in blood screening around the world*; Medical Laboratory Observer; April 2011; [online] c; NP Communications, LLC; cit. 11.11.2013; available from <<http://www.mlo-online.com/articles/201104/nat-in-blood-screening-around-the-world.php>>
69. ROTH, W. K. 1; BUSCH, M. P. 1; SCHULLER, et al. 1 *International survey on NAT testing of blood donations: expanding implementation and yield from 1999 to 2009*, International Forum; *Vox Sanguinis*. 102(1):82-90, January 2012.
70. LAPERCHE, S. *Blood safety and nucleic acid testing in Europe*, *Eurosurveillance*, Vol.10, Issues 1-3, Jan-Mar 2005.
71. ZOU, S., FANG, C.,T., DOSS, Ry., *A method for estimating incidence rate of infectious diseases among first-time blood donors*, *Transfusion*, 2008, Sep;48(9):1827-32. Epub 2008 May 14.

Seznam použitých zkratk

RT-Real Time PCR	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase s reverzní transkripcí
HCV	Virus hepatitidy C
HBV	Virus hepatitidy B
HIV	Lidský virus imunitní nedostatečnosti
CMIA	Chemiluminiscenční imunoanalýza na paramagnetických mikročásticích
FTO VFN	Fakultní transfuzní oddělení Všeobecné fakultní nemocnice
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
HCT	Hematokrit
HB	Hemoglobin
TK	Tlak krve
CMV	Cytomegalovirus
HLA	Human Leucocyte Antigen
IgA	Imunoglobulin A
EBV	Epstein-Barrové virus
HAV	Virus hepatitidy A
HDV	Virus hepatitidy D
HEV	Virus hepatitidy E
RNA	Ribonucleic Acid
RIBA	Rekombinantní Imunoblot
DNA	Deoxyribonucleic Acid
CRF	Circulating Recombinant Forms
URF	Unique Recombinant Forms
HHV-6	Lidský herpetický virus 6
HHV-8	Lidský herpetický virus 8
WNV	West Nile Virus
PrP	Prionový protein
EEG	Elektroencefalogram
vCJD	variant Creutzfeld – Jacob Disease
NAT	Nucleic Acid Testing

PCR	Polymerázová řetězová reakce
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
ELISA	Enzymová imunoanalýza, Enzyme Linked Immunosorbent Assay
PK	Plná krev
PA	Plazma z aferézy
P	Plazma z plné krve
OC	Odběrové centrum
RLU	Relative Light Units
CO	Cut off
S	Signál v RLU
TMP	Transmembránový protein HIV
NRL	Národní referenční laboratoř
ALT	Alaninaminotransferáza
EBR	Erytrocyty bez buffy-coatu resuspendované
ÚZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky
ZTS	Zařízení transfuzní služby
STL ČLS JEP	Společnost pro transfuzní lékařství České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně
SZÚ	Státní zdravotní ústav
MZČR	Ministerstvo zdravotnictví České republiky
ZP	Zdravotní pojišťovny
ČR	Česká republika
SZÚ	Státní ústav pro kontrolu léčiv
NRC	Národní referenční centrum
USA	Spojené státy americké
TMA NAT	Transcription Mediated Amplification NAT
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EU	Evropská unie
EEA	European Economic Area

Seznam tabulek

Tabulka 1: Porovnání nomenklatur krevních skupin (ekvivalentní nomenklatury)	11
Tabulka 2: Minimální požadavky výsledků předodběrového vyšetření.....	18
Tabulka 3: Minimální akceptovatelné výsledky fyzikálního vyšetření dárce	22
Tabulka 4: Přehled infekčních agens, u kterých byl prokázán přenos transfuzí.....	30
Tabulka 5: Sérologické a molekulárně-genetické nálezy u infekce HBV a jejich význam	36
Tabulka 6: Přehled termostabilních DNA-polymeráz a jejich charakteristika podle exonukleázové aktivity	62
Tabulka 7: Přehled vyšetření infekčních markerů u dárců krve v Evropě (stav v roce 2010).....	69
Tabulka 8: Přehled vyšetřovaného souboru - vzorky	75
Tabulka 9: Přehled vyšetřovaného souboru - dárcei	77
Tabulka 10: Přehled interpretace výsledků pro systém Abbott Architect i2000	91
Tabulka 11: Senzitivita a specifita použitých metod (Abbott CMIA).....	92
Tabulka 12: Window perioda (diagnostické okno) u sledovaných infekcí při použití imunoanalytických metod (Abbott CMIA).....	92
Tabulka 13: Interpretace výsledků z PDM softwaru	104
Tabulka 14: Průměrná klinická specifita testu cobas TaqScreen MPX.....	105
Tabulka 15: Analytická senzitivita testu cobas TaqScreen MPX.....	106
Tabulka 16: Window perioda (diagnostické okno) u sledovaných infekcí při použití testu cobas TaqScreen MPX.....	108
Tabulka 17: Porovnání window period při použití obou typů testování.....	109
Tabulka 18: Přehled vzorků reaktivních na systému Architect i2000 (skupina vzorků č.1)	110
Tabulka 19: Přehled vzorků reaktivních na systému cobas s201 (skupina vzorků č.1).....	111
Tabulka 20: Přehled testování vzorků reaktivních na systému cobas s201 v NRL pro virové hepatitidy	113
Tabulka 21: Přehled testování vzorků reaktivních na systému cobas s201 v NRL pro AIDS	113

Tabulka 22: Přehled testování archivních vzorků z odběrů, které byly na systému cobas s201 označeny jako reaktivní v NRL pro virové hepatitidy	115
Tabulka 23: Přehled dalších vyšetřovaných vzorků dárců reaktivních na systému cobas s201	116
Tabulka 24: Dárci pozitivně confirmovaní v NRL (2004-2010, FTO VFN)	121
Tabulka 25: Dárci pozitivně confirmovaní v NRL (2004-2010, ČR)	122
Tabulka 26: Výsledky testování druhé skupiny vzorků na systému cobas s201	124
Tabulka 27: Výsledky testování druhé skupiny vzorků NAT v ÚKBLD VFN.....	125
Tabulka 28: Souhrnná tabulka testování druhé skupiny vzorků.....	127
Tabulka 29: Údaje o pozitivně confirmovaných dárcích v ČR v období 2004-2010...	131
Tabulka 30: Průměrný počet pozitivně confirmovaných dárců v ČR za kalendářní rok	132
Tabulka 31: Vliv plasmaferetických center na počty confirmovaných.....	132
Tabulka 32: Údaje o prvodárcích ve FTO VFN v období 2004-2010.....	134
Tabulka 33: Údaje o opakovaných dárcích ve FTO VFN v období 2004-2010.....	135
Tabulka 34: Základní kalkulace nákladů (diagnostika) na testování infekčních markerů (HBV, HCV, HIV) u dárců krve metodou NAT v České Republice.....	137

Seznam obrázků

Obrázek 1: Sérologické nálezy v průběhu onemocnění hepatitidou A.....	32
Obrázek 2: Sérologické nálezy v průběhu onemocnění akutní hepatitidou B (bez přechodu do chronicity)	35
Obrázek 3: Sérologické nálezy v průběhu progresu akutní hepatitidy B do chronicity .	35
Obrázek 4: Obecné schéma polymerázové řetězové reakce	63
Obrázek 5: Systém Abbott Architect i2000 (Abbott)	83
Obrázek 6: Uspořádání metody ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo (Abbott)	85
Obrázek 7: Uspořádání metody ARCHITECT HBsAg (Abbott)	86
Obrázek 8: Uspořádání metody ARCHITECT anti-HCV (Abbott)	88
Obrázek 9: Systém cobas s201	95
Obrázek 10: Automatický pipetor Hamilton Microlab Star	97
Obrázek 11: Zařízení pro izolaci a purifikaci nukleové kyseliny vzorku cobas.....	98
Obrázek 12: Amplifikace a detekce nukleové kyseliny – analyzátor cobas TaqMan ..	100
Obrázek 13: Detail výsledku analýzy vzorku (Complete Non reactive)	104
Obrázek 14: Pozice testovaných vzorků na archivní desce	118
Obrázek 15: Schéma záznamu pozic archivních vzorků na destičce 43/08	119

Seznam grafů

Graf 1: Rozdělení vyšetřovaných vzorků dle typu odběru	76
Graf 2: Rozdělení vyšetřovaných vzorků dle pohlaví	76
Graf 3: Počet vyšetřených vzorků opakovaných dárců a prvodárců v České republice (2004 – 2010).....	122
Graf 4: Počet vyšetřených vzorků opakovaných dárců a prvodárců ve FTO VFN (2004 – 2010).....	123

Přílohy