

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd



LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA VIROVÝCH HEPATITID

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí bakalářské práce: PharmDr. Miloslava Netopilová

Hradec Králové 2009

Kristina Brejtrová

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

V Hradci Králové 5. 5. 2009

.....

Děkuji mé vedoucí bakalářské práce PharmDr. Miloslavě Netopilové za odborné vedení, za její rady, připomínky, pečlivou kontrolu již napsaného textu a čas, který mi věnovala.

OBSAH (BAKALÁŘSKÉ PRÁCE)

1. ÚVOD.....	6
2. CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE.....	7
3. VIROVÉ HEPATITIDY	8
3.1. AKUTNÍ VIROVÁ HEPATITIDA A	8
3.2. AKUTNÍ VIROVÁ HEPATITIDA B	10
3.3. AKUTNÍ VIROVÁ HEPATITIDA C	14
3.4. AKUTNÍ VIROVÁ HEPATITIDA D	16
3.5. AKUTNÍ VIROVÁ HEPATITIDA E	17
3.6. AKUTNÍ VIROVÁ HEPATITIDA G	18
3.7. CHRONICKÉ HEPATITIDY	19
3.7.1. CHRONICKÁ HEPATITIDA B.....	19
3.7.2. CHRONICKÁ HEPATITIDA C.....	20
3.8. MOŽNOST OPAKOVANÉHO ONEMOCNĚNÍ VIROVOU HEPATITIDOU	21
4. DIAGNOSTIKA VIROVÝCH HEPATITID	23
4.1. IMUNOLOGICKÉ METODY	23
4.1.1. ENZYMOVÁ IMUNOANALÝZA NA MIKROČÁSTICÍCH (MEIA).....	23
4.1.2. IMUNOANALÝZA VYUŽÍVAJÍCÍ FLUORESCENČÍ POLARIZACI (FPIA)	24
4.1.3. REKOMBINANTNÍ IMUNOBLOTOVÁ ANALÝZA (RIBA).....	25
4.2. MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ METODY	26
4.2.1. POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE	26
4.3. IMUNOLOGICKÉ MARKERY.....	28
4.3.1. Protilátky anti-HAV IgM	28
4.3.2. Celkové protilátky anti-HAV	28
4.3.3. Antigen HBsAg.....	29
4.3.4. Protilátky anti-HBs	29
4.3.5. Protilátky anti-HBc IgM	29
4.3.6. Protilátky anti-HBc (IgG a IgM).....	30

4.3.7.	Antigen HBeAg	30
4.3.8.	Protilátky anti-HBe	30
4.3.9.	Stanovení HBV DNA.....	31
4.3.10.	Protilátky anti-HCV.....	31
4.3.11.	Genotypizace HCV	31
4.3.12.	Průkaz hepatitidy D	32
4.3.13.	Průkaz hepatitidy E.....	32
4.3.14.	Průkaz hepatitidy G	32
5.	HEPATÁLNÍ IKTERUS.....	33
6.	ENZYMOVÁ VYŠETŘENÍ U VIROVÝCH HEPATITID.....	35
7.	PREVENCE.....	37
7.1.	OBECNÁ PREVENTIVNÍ OPATŘENÍ.....	37
7.2.	VAKCINACE VIROVÉ HEPATITIDY A.....	38
7.3.	VAKCINACE VIROVÉ HEPATITIDY B.....	38
7.4.	MOŽNOST DUÁLNÍ PROTEKCE PROTI VIROVÉ HEPATITIDĚ A, B	39
8.	TERAPIE AKUTNÍCH A CHRONICKÝCH VIROVÝCH HEPATITID.....	41
8.1.	LÉČBA VIROVÉ HEPATITIDY B	41
8.2.	LÉČBA VIROVÉ HEPATITIDY C	42
9.	ZÁVĚR	44
	SEZNAM ZKRATEK	46
	PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	49

1. ÚVOD

Virové hepatitidy jsou závažným zdravotnickým problémem - akutní i chronické formy jsou příčinou významné morbidity a mortality u nás i ve světě. V celosvětovém měřítku jsou akutní virové hepatitidy nejčastějším jaterním onemocněním a jsou příčinou úmrtí 1-2 miliónů osob ročně. Některé viry způsobují chronickou hepatitidu, jejímž následkem pak mohou být jaterní cirhóza a hepatocelulární karcinom. I přes pokrok v diagnostice a terapii umírá na následky chronických forem ročně dalších několik miliónů osob. Nemocní lidé jsou často zdrojem nákazy pro své okolí, zdravotnický personál nevyjímaje. Ročně je v naší republice hlášeno asi 1300 nových případů virových hepatitid A, B a C, z tohoto počtu připadá více než 800 případů na hepatitidu typu C (tab. 1). Vzhledem k průběhu onemocnění virovou hepatitidou typu C lze však předpokládat, že celkový počet je ještě vyšší, protože řada případů uniká správné diagnóze. Neméně důležité jsou i ekonomické ztráty spojené s pracovní neschopností, léčbou i eventuální invalidizací. Virové hepatitidy představují velmi závažný zdravotnický problém, který se týká také naší republiky (Husa, 2007).

Tab. 1 - Počet hlášených případů virových hepatitid (VH) v České republice v letech 1996 - 2006 (Husa, 2007)

	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
VHA	2083	1195	904	933	614	325	127	114	70	322	132
VHB	680	564	575	363	604	457	413	370	392	361	307
VHC	279	273	448	634	637	798	858	846	868	839	1022
VHE	1	5	17	5	12	13	12	21	36	37	35

2. CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

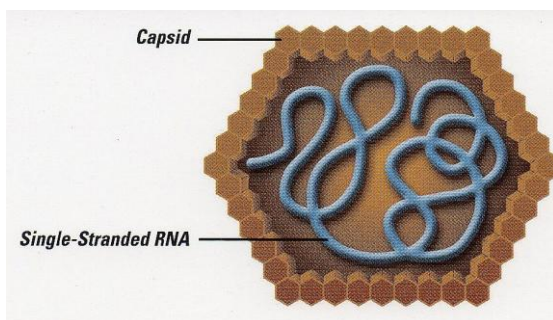
Cílem této bakalářské práce je vytvořit přehled laboratorní diagnostiky jednotlivých typů virových hepatitid. Práce nabízí přehled hepatitid, zařazených do dvou skupin, podle průběhu onemocnění na akutní a chronické. Popisuje virus, ale především vytváří přehled stanovovaných markerů, jejich průběh a vzájemné prolínání se během onemocnění. Dále se zmiňuje o metodách sérologických a molekulárně genetických, které se v současné době používají při stanovování jednotlivých typů hepatitid. Práce stručně popisuje principy a zmiňuje se o hodnotách, při kterých je stanovovaný vzorek brán jako reaktivní, tudíž infekční. Mimo jiné nabízí přehled používaných antivirových preparátů, které se uplatňují při prevenci a léčbě, dosud však známé jen u hepatitid A, B, C. Okrajově se zmiňuje o účincích a možnostech kombinace preparátů.

3. VIROVÉ HEPATITIDY

Virové hepatitidy tvoří samostatnou skupinu infekcí, vyvolanou několika původci. Znamená to, že se jedná o různá onemocnění, i když s podobným klinickým obrazem (tj. s podobnými příznaky). Vžitý název "žloutenka" (ikterus) vychází z častého průvodního příznaku, tj. žlutého zbarvení kůže a sliznic, způsobeného žlučovým barvivem bilirubinem. Příčiny žloutenky jsou různé, ale v případě virových hepatitid se jedná o difúzní zánětlivě – nekrotická poškození jater. Podle průběhu onemocnění rozlišujeme virové hepatitidy na akutní (A, B, C, D, E, G) a chronické (B, C, D) (Ehrmann a kol., 2003).

3.1. AKUTNÍ VIROVÁ HEPATITIDA A

Virus hepatitidy A je malý neobalený RNA virus o průměru 27-33 nm. Jde o prototypový virus rodu *Hepatovirus* čeledi *Picornaviridae*. K přenosu infekce dochází fekálně-orální cestou. V průběhu inkubace, která trvá 15-45 dnů, je virus prokazatelný ve stolici a 14 dní před nástupem klinických příznaků i v krvi pacienta. Virus se zřejmě nejprve replikuje v trávicím traktu a pak teprve proniká k jaterním buňkám, kde se pomalu množí v cytoplazmě hepatocytů. Replikace je provázena vakuolizací a degenerací infikovaných buněk a difúzní zánětlivou reakcí. Chronická hepatitida A s perzistencí viru v organismu dosud nebyla popsána. Existuje však i netypický protražovaný průběh. Virová hepatitida A se vyskytuje na celém světě, vyšší výskyty jsou v zemích s nízkým hygienickým standardem. Česká republika patří mezi země s relativně nízkým výskytem (tab. 1) (Husa, 2005).



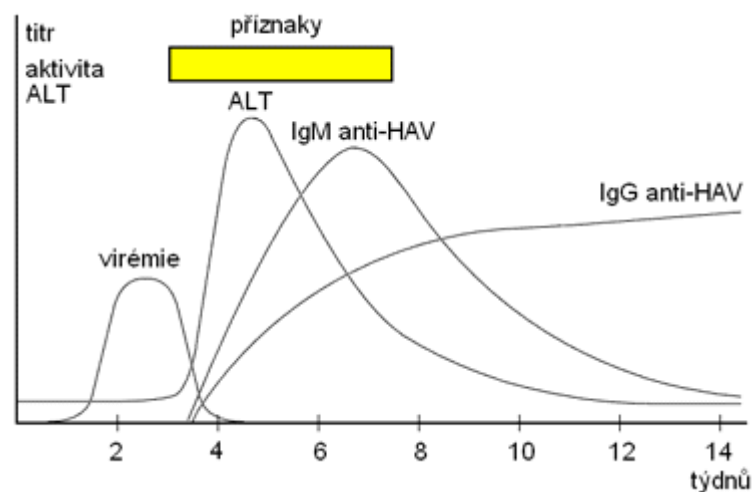
Obr. 1 – Virus hepatitidy A (Anonym, 2004)

Hepatitida A je spontánně odeznívající onemocnění, často bez klinicky zjevných příznaků, zejména u dětí. Protože symptomatickou virovou infekci hepatitidy A (HAV) nelze vždy z klinického hlediska rozpoznat od virové infekce hepatitidy B nebo C, je testování vzorků séra důležitým prostředkem ke zjištění správné diagnózy. Během akutního stádia infekce HAV se v séru pacienta objeví protilátky proti viru hepatitidy A třídy IgM, které jsou téměř vždy detekovatelné při nástupu symptomů (Husa, 2005).

Protilátky anti-HAV IgM v séru jsou relativně dostupným testem pro diagnózu. Vzestup protilátek vrcholí mezi 21. až 30. dnem onemocnění, pozitivita přetrvává 2-4 měsíce. Asi u 10-14 % pacientů přetrvává 6-7 měsíců. V průběhu 12 měsíců klesne na nedetekovatelnou úroveň. Koncentrace IgG rovněž rychle stoupá a ve dvou třetinách případů dosahuje maxima kolem 80. dne onemocnění. Pozitivita anti-HAV IgG přetrvává dlouho, mnohdy celoživotně. Průkazem antigenu HAV ve stolici nebo jaterní tkáni je možno rozpoznat kontaktem infikované osoby ještě před klinickými projevy onemocnění. Vylučování viru svědčí o infekci pacienta. Pozitivita se objevuje 1-2 týdny po začátku infekce a může trvat velmi krátce. Při začátku klinických projevů bývá pozitivita testu už jen u 50 % případů (Masopust, 1998).

Mimo klinický nález je pro diagnózu typická vysoká aktivita ALT a AST, při cholestatické formě je zvýšená aktivita ALP a GGT. Časté je zvýšení sérového železa. V krevním obraze je lymfocytóza (Ehrmann a kol., 2003).

Závažnost onemocnění závisí na věku, ve kterém se člověk tímto virem infikuje. To platí také o výskytu ikteru. Ikterus bývá u HAV často velmi výrazný, ale zřídka přetrvává déle než 2 až 4 týdny. V případě relapsu HAV dochází většinou jen k elevaci aminotransferáz a hladiny bilirubinu zůstávají v mezích normy (Ehrmann a kol., 2003).

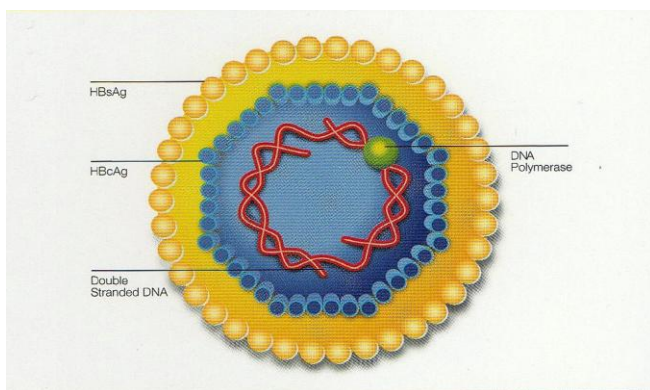


Obr. 2 – Sérologické markery virové hepatitidy A (Anonym, 2004)

3.2. AKUTNÍ VIROVÁ HEPATITIDA B

Virová hepatitida B je jedním z nejzávažnějších zdravotnických problémů současnosti, a to především v rozvojových zemích světa. Odhaduje se, že se během svého života nakazí více než 2 miliardy osob virem HBV, a že v současnosti je chronicky infikováno 350-400 milionů lidí (největší počet z nich žije v Číně, Brazílii a Koreji).

Virus hepatitidy B je malý obalený DNA virus o průměru 42 nm. Patří do čeledi *Hepadnaviridae*. Virus se přenáší především krví, ale je přítomen i ve spermatu, vaginálních sekretech a v malé koncentraci i ve slinách a moči. Inkubační doba je 30-180 dní, většinou 2-3 měsíce. Replikuje se pomocí reverzní transkripce. Je všeobecně znám jako Daneova částice. Strukturálně se dělí na část dřevnou (nukleokapsidu) a obal. Obal obsahuje především povrchový (surface) antigen HBsAg, známý jako „australský“ antigen a dále glykoproteiny, proteiny a lipidy. Součástí nukleokapsidy je nukleová kyselina HBV DNA. Struktura DNA je dvouvláknová, cirkulární s jednovláknovým úsekem, který obsahuje 600-2100 nukleotidů. Celkem se genom HBV skládá asi z 3200 nukleotidů a představuje tak nejmenší genom ze známých DNA virů. Dále nukleokapsida obsahuje dřevný (core) antigen HBcAg a další antigen nazývaný „e“ HBeAg, který je proteinovou podjednotkou dřevě a dále nejdůležitější virový enzym DNA-polymerázum (Husa,05;Stránský, 2001).



Obr. 3 – Virus hepatitidy B (Anonym, 2005)

Po infekci virem hepatitidy B nastává po určité době pomnožení viru v játrech (replikace virové DNA). V té době lze v játrech prokázat HBcAg. Proteinový obal viru se tvoří v endoplasmatickém retikulu a spolu s materiálem HBcAg dává kompletní virové částice, které lze prokázat v elektronovém mikroskopu jako Daneova částice. Nadbytečná

tvorba proteinového obalu vede k vylučování HBsAg do krevní cirkulace a stává se tak markerem infekce virem. HBcAg zůstává v játrech, do krevního oběhu není vylučován. HBsAg obsahuje 3 různé virové proteiny a lipidy hostitelského původu. Proteiny jsou produkty translace jediného genu a liší se pouze místem, ze kterého byl přepis nastartován. Jsou označovány písmeny S, M, L. HBs obsahuje všem kmenům HBV společnou antigenní determinantu „a“ s alelovými páry „d-y“ a „w-r“. To je podkladem 4 antigenních subtypů: adw, adr, ayw, ayr. Jejich určení má epidemiologický význam (Masopust, 1998).

Genom HBV obsahuje čtyři geny, které kódují antigeny HBV, a to gen P, který kóduje DNA polymerázu a obkružuje většinu virového genomu, gen S, který kóduje HBsAg, jehož úsek pre-S1 se podílí na rozpoznání viru receptory hepatocytu, gen C, který kóduje HBcAg, HBeAg a gen X, který působí jako aktivátor virové transkripce (Stránský, 2001).

Jednotlivé geny se vzájemně částečně překrývají. Tyto čtyři geny tvoří kódující úseky bez stop kodonů, nazývaných otevřené čtecí rámečky (open reading frames, ORF). Všechny čtyři ORF jsou na vlákně minus DNA, které je kompletní a kóduje mRNA pro odpovídající proteiny HBc, HBe, pol, HBs a X. Vlákno plus je zpravidla inkompletní (Masopust, 1998).

Období replikace viru v hepatocytech je charakterizováno přítomností HBsAg, HBeAg, VHB-DNA a DNA-polymerasy (markery replikace). Z hlediska organismu pacienta můžeme rozlišit dvě varianty tohoto stádia:

- a) imunoeliminaci, při níž cytotoxické lymfocyty rozpoznávají infikované hepatocyty (tj. ty, které exprimují na své membráně HBsAg) a navozují jejich lýzu, což se projevuje zvýšením hladiny nitrobuňkových enzymů v cirkulaci,
- b) imunotoleranci, kdy lymfocyty (z dosud nejasných důvodů) nejsou schopny rozpoznat či lyzovat infikované hepatocyty, takže zvýšení enzymů v krvi se neobjeví (Masopust, 1998).

Sérologická diagnostika VHB je poměrně komplikovaná, protože se sleduje přítomnost řady virových antigenů a protilátek proti nim.

Metody na stanovení antigenu HBsAg se používají ke screeningovému vyšetření krve a krevních derivátů s cílem předejít přenosu viru hepatitidy B (HBV) na příjemce. Testy se běžně používají ke stanovení diagnózy při podezření na infekci HBV a k monitorování stavu infikovaných jedinců, tj. zda infekce u pacienta odezněla nebo zda

se pacient stal chronickým nosičem viru. Dále se tato metody používají k vyhodnocení účinnosti podávaných antivirových léků, kdy se u pacienta průběžně monitorují hladiny HBsAg. Organizace Centers for Disease Control and Prevention v USA doporučuje prenatální screening všech těhotných žen, aby mohla být novorozencům matek, které jsou nosičkami HBV, poskytnuta profylaktická péče. Antigen HBsAg se objevuje v krvi asi za 6 týdnů po infekci a většinou vymizí do 3 měsíců po klinickém onemocnění. Perzistence antigenu déle než 6 měsíců je známkou chronicity (Anonym, 2004; Husa, 2005).

Protilátky anti-HBs jsou přítomny po infekci virem hepatitidy B nebo po vakcinaci proti hepatitidě B. Metody k stanovení protilátek anti-HBs se často používají k monitorování úspěšnosti vakcinace proti hepatitidě B. Přítomnost těchto protilátek je důležitá pro ochranu před infekcí HBV. Přítomnost protilátek anti-HBs po akutní infekci HBV a vymizení HBsAg jsou užitečnými indikátory uzdravení. Detekce protilátek anti-HBs u asymptomatického jedince může znamenat předchozí kontakt s HBV (Anonym, 2004).

Antigen HBeAg se používá při diagnostice a monitorování průběhu virové hepatitidy B. Objevuje se v časně fázi infekce hepatitidy B, po nástupu povrchového antigenu viru hepatitidy B. Titr těchto dvou antigenů v průběhu virové replikace prudce stoupá. Přítomnost HBeAg koreluje se zvýšeným počtem infekčních virových částic (Daneova částice), výskytem částic core v jádru hepatocytu a přítomností virové specifické DNA polymerázy v séru. V tomto období jsou přítomny také další sérologické indikátory jaterní patologie. V období, kdy je pacient s hepatitidou B pozitivní na HBeAg, existuje zvýšené riziko přenosu viru HBV. Perzistence HBeAg u nosičů HBV je často spojena s chronickou hepatitidou (Anonym, 2004).

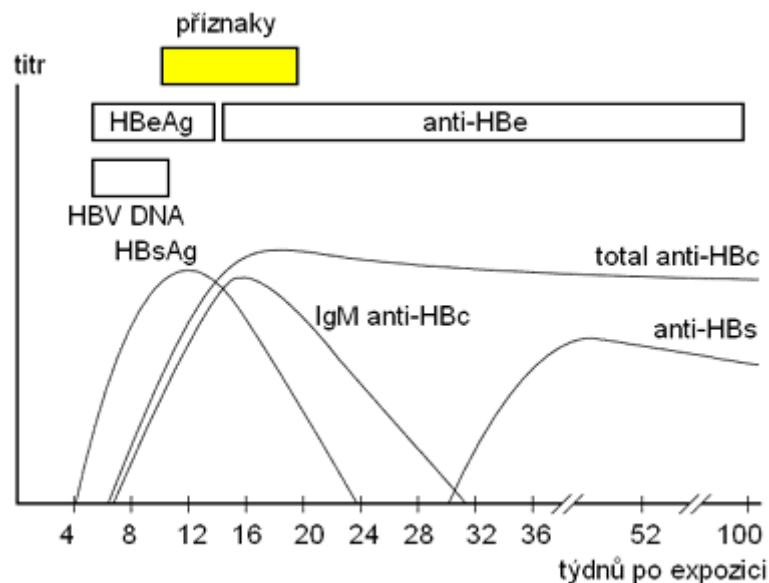
Přítomnost protilátek anti-HBe může znamenat jak akutní, tak chronickou virovou infekci hepatitidy B. Přítomnost protilátek znamená sníženou hladinu infekčního viru v důsledku poklesu virové replikace. Přestože poté většinou následuje rekonvalescence, může se stát, že přetrvává stav nosičství HBsAg. Fáze „sérokonverze“ HBe na anti-HBe nastává normálně za 2-4 měsíce od počátku akutní infekce, ale při typické chronické infekci ji lze pozorovat třeba až za několik let. Přibližně u 2/3 případů dochází 1 až 3 měsíce před sérokonverzí k výraznému zvýšení katalytické koncentrace ALT a AST v séru bez klinických projevů zhoršení nemoci. Je to způsobeno imunitní reakcí, při které dochází k eliminaci viru, což je provázeno zvýšenou nekrózou (Anonym, 2004; Masopust, 1998).

Antigen HBcAg nelze detekovat v cirkulující krvi, detekovatelné jsou pouze protilátky anti-HBc. Vysoké titry protilátek anti-HBc IgM jsou nejdůležitější sérologickou

známkou akutní virové hepatitidy B. Tyto protilátky lze také použít k rozlišení, zda je akutní hepatitida způsobena HBV nebo infekcí jiným virem (Anonym, 2004).

Přítomnost protilátek anti-HBc IgG může znamenat jak akutní, tak i chronickou infekci hepatitidy B. Při akutní infekci jsou protilátky anti-HBc zjištěny v séru krátce poté, co se objeví povrchový antigen viru hepatitidy B (HBsAg). Protilátky přetrvávají v době mezi vymizením HBsAg a objevením se detekovatelných protilátek proti HBsAg. V případě, že nejsou k dispozici informace o žádných dalších markerech viru HBV, musí se vzít v úvahu, že pacient s detekovatelnou hladinou protilátek anti-HBc může být aktivně infikován HBV, nebo že u něj mohlo dojít k odeznění infekce a pacient získal imunitu (Anonym, 2004).

HBV DNA je nejcitlivějším ukazatelem virové replikace. Detekuje se molekulárně hybridizačními metodami nebo polymerázovou řetězcovou reakcí (PCR). DNA-polymerasa (průkaz v séru) slouží jako test na infekciozitu pacienta (Husa, 2005).

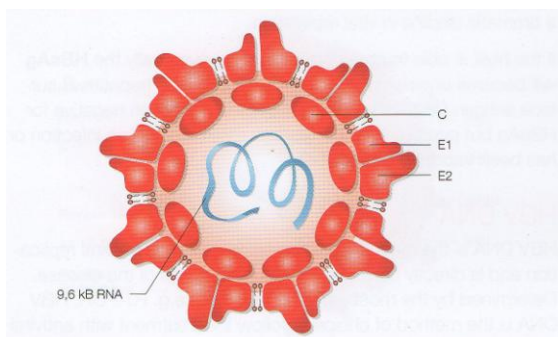


Obr. 4 – Sérologické markery akutní virové hepatitidy B (Anonym, 2004)

Onemocnění probíhá v dětství většinou aniktericky, v dospělosti asi třetina případů iktericky, třetina pod obrazem nespecifických chřipkových příznaků a třetina zcela asymptomaticky. Ikterus se vyvíjí většinou současně s poklesem intenzity prodromálních příznaků. Délka ikterického stádia je obecně delší než u hepatitidy A. U většiny nemocných žloutenkou a další klinické projevy onemocnění odeznějí za 1-3 měsíce, ale ani protahovanější průběhy nejsou vzácné (Ehrmann a kol., 2003).

3.3. AKUTNÍ VIROVÁ HEPATITIDA C

Existenci viru prokázal Houghton v roce 1989 originálním klonováním. Virus hepatitidy C je malý obalený RNA virus o velikosti 30-80 nm, který patří do čeledi *Flaviviridae*. Nejnověji byl klasifikován jako zatím jediný zástupce rodu *Hepacivirus*. Genetická variabilita HCV je obrovská a je pravděpodobně způsobena velkou frekvencí mutací při dlouhodobém průběhu infekce a velmi rychlém obratu viru v organismu. Denní produkce viru je obrovská a odhaduje se na 10^{10} - 10^{12} . Poločas života VHC je pouze 2,7 hodiny, proto je pravděpodobnost vzniku „chyb“ při přepisu genetické informace viru značná (Husa, 2005).



Obr. 5 – Virus hepatitidy C (Anonym, 2004)

Nejčastěji používaná Simmondsova klasifikace rozeznává šest hlavních genotypů viru (1-6) a velké množství subtypů, značených malými písmeny abecedy. Tato klasifikace je založena na fylogenetické analýze. Některé genotypy (1a, 2a a 2b) jsou rozšířeny celosvětově, zatímco jiné (např. 5a a 6a) lze nalézt jen v určitých geografických oblastech. V Evropě a USA je nejrozšířenější genotyp 1b. V České republice jednoznačně převládá infekce tímto genotypem. Je to ovšem velmi nepříznivá situace, protože pacienti infikovaní tímto genotypem viru nejhůře reagují na antivirovou terapii (Stránský, 2001).

Virus hepatitidy C obsahuje jednovláknovou pozitivní RNA. Virový genom se skládá z 9379 nukleotidů a má jeden dlouhý otevřený čtecí rámeček (ORF). Syntetizovaný polyproteinový prekurzor má 3010-3030 aminokyselin. Tento meziprodukt je rozštěpen do několika strukturních a nestrukturních proteinů: dvou obalových glykoproteinů E1 a E2, nukleokapsidového proteinu (core-C) a několika nestrukturních proteinů (NS1-NS5). Funkce některých nestrukturních proteinů HCV již byly objeveny. NS3 má helikázovou a proteázovou aktivitu, zatímco protein NS5 obsahuje RNA-dependentní RNA-polymerázu. Všechny tyto funkce jsou nezbytné pro množení

viru, vývoj nových antivirových preparátů je cílen právě proti těmto nestrukturním proteinům HCV. Protein C pravděpodobně reguluje apoptózu infikovaných buněk, a může se proto přímo uplatňovat v patogenezi jaterní choroby, proliferaci buněk a vývoji hepatocelulárního karcinomu. Tento protein, stejně jako protein NS5A, pravděpodobně interferuje s nitrobuněčným metabolismem lipidů a lipoproteinů a tím přímo ovlivňuje vznik steatózy, jejíž přítomnost je častým histologickým nálezem u nemocných s chronickou hepatitidou C. Protein NS5A navíc obsahuje určitou oblast, která přímo reguluje buněčnou odpověď na interferon α (Husa, 2005).

Průběh nemoci může být od samého počátku asymptomatický (až 50 %), takže diagnóza je určena až v chronickém stadiu. Asi u 5 % případů se rozvine fulminantně s vysokou mortalitou (80-90 %). Chronická forma (vznikající až v 80 % po infekci), může probíhat jako relapsující nebo jako kontinuální, eventuelně jako bezpříznakové nosičství. Asi 20 % pacientů progreduje do cirhózy nebo hepatocelulárního karcinomu (Stránský, 2001).

Pro průkaz infekce virem hepatitidy C (současné nebo proběhlé) se rutinně používá vyšetření specifického IgG namířeného proti HCV-antigenu (anti-HCV IgG). Přítomnost protilátek anti-HCV IgG může znamenat, buď překonanou infekci HCV a zhojenou bez následků, proběhlou infekci HCV s přetrvávající virémií a chudým klinickým a laboratorním nálezem, nebo chronickou virovou hepatitidu C s odpovídajícím klinickým, laboratorním a histologickým nálezem a pozitivitou testu HCV-RNA. Nepřímým důkazem akutní infekce je průkaz anti-HCV IgM, který však není zatím rutinně dostupný. Virémii je možno s určitostí stanovit vyšetřením virové RNA metodou PCR. Toto je nutné před rozhodnutím, zda nasadit léčbu interferonem α (Masopust, 1998).

V případě průkazu protilátek anti-HCV je nutné doplnit vyšetření na přítomnost VHC RNA v séru pomocí PCR, s dolním detekčním limitem 50 mezinárodních jednotek (IU) na mililitr, či metodou transcription-mediated amplification (TMA), která je schopna detekovat naprosto minimální hladinu HCV RNA, konkrétně 5-10 IU/ml. Přitom mohou nastat dvě možnosti, buď pozitivita anti-HCV i HCV RNA (nejčastěji jde o nemocného s chronickou infekcí HCV, méně často o akutní hepatitidu C), nebo pozitivita anti-HCV a negativita HCV RNA (mnohem méně častý nález, který lze interpretovat jako stav po akutní hepatitidě C, která nepřešla do chronicity, nebo jde o pacienta vyléčeného z chronické infekce HCV) (Zima, 2007).

Pokud jde o pacienta imunosuprimovaného nebo je podezření, že jde o akutní infekci HCV, má význam provádět průkaz HCV RNA i při negativitě anti-HCV. V tomto

případě lze někdy prokázat pozitivní HCV RNA i bez přítomnosti protilátek anti-HCV, které se buď ještě nestačily vytvořit, nebo je jejich tvorba tlumena při imunosupresi (Stránský, 1999).

HCV je virus přenášený krví, který úzce souvisí s krevní transfuzí. Sérologické studie využívající EIA k detekci protilátek proti rekombinantním antigenům HCV prokázaly, že virus HCV je příčinou většiny non-A, non-B hepatitid, a to jak infekcí přenášených krví, tak infekcí šířených v komunitě. Přítomnost protilátek anti-HCV indikuje, že jedinec může být nosičem infekčního HCV. Ačkoliv může být většina infikovaných jedinců asymptomatických, infekce HCV může vést ke vzniku chronické hepatitidy, cirhózy nebo ke zvýšení rizika vzniku hepatocelulárního karcinomu. Diferenciálně diagnosticky je třeba odlišit především autoimunitní hepatitidy (jedna z kontraindikací léčby interferonem α , který je lékem u chronické hepatitidy C, je pozitivita protilátek proti hladké svalovině) a metabolické jaterní choroby (Masopust, 1998).

Ikterus je vzácný, v průběhu akutní HCV se objevuje u méně než 15% nemocných (Ehrmann a kol., 2003).

3.4. AKUTNÍ VIROVÁ HEPATITIDA D

Virus hepatitidy D je nekompletní virová částice mající 35 nm v průměru. Jde o unikátní infekční agens, které je více podobné virům rostlin než jiným živočišným virům. Podle posledních poznatků tvoří HDV samostatný rod čeledi *Deltaviridae*. Jedná se tzv. satelitní virus, což znamená subvirovou částici, která obsahuje určitou nukleovou kyselinu, zejména RNA, a která potřebuje jiný pomocný virus pro svůj přenos a množení. Satelitní virus by měl mít nukleovou kyselinu podstatně odlišnou od nukleové kyseliny pomocného viru. Konkrétně virus hepatitidy D není schopen přenosu a množení bez přítomnosti HBV. Mezi živočišnými viry není zatím znám jiný satelitní virus než HDV (Husa, 2005).

Obal viru hepatitidy D tvoří povrchový antigen HBV (HBsAg), v jádru je antigen viru hepatitidy D (HDAg). Virus hepatitidy D obsahuje RNA, která kóduje strukturální protein HDAg. Zatím byly identifikovány 3 genotypy HDV – I, II a III. Infekce genotypem III má nejtěžší klinický průběh, méně závažný je průběh infekce genotypu I, nejlehčí je infekce genotypu II. Nejčastěji se vyskytuje genotyp I, který převládá ve Středozemí,

v Africe, Evropě a Americe. Inkubační doba hepatitidy D není zatím přesně určena. Vzhledem k nutnosti současné přítomnosti HBV se musí pohybovat v rozmezí inkubační doby akutní HBV (Husa, 2005).

V praxi může dojít ke dvěma klinicky různě závažným situacím:

1. koinfekce HBV a HDV. Pacient se tímto případem nakazí ve stejnou dobu oběma viry. U infikované osoby můžeme postupně detekovat sérologické ukazatele typické pro akutní hepatitidu B, následované většinou s několikadenní latencí zjištěním protilátek anti-HDV IgM. Biochemicky se to projeví dvojfázovým vzestupem aktivity ALT. Výsledek koinfekce je příznivý a jen 2-7 % pacientů přechází do chronicity;
2. superinfekce HDV na chronickou infekci HBV. V tomto případě dojde u pacienta s chronickou infekcí HBV k akutní exacerbaci chronické hepatitidy, k rychlé progresi do jaterní cirhózy nebo k dekompenzaci již existující cirhózy. Velmi častá je i fulminantní hepatitida. Obecně jde o mnohem závažnější situaci (Ehrmann a kol., 2003).

Akutní HDV může probíhat pod obrazem benigní akutní virové hepatitidy, ikterické či anikterické (Ehrmann a kol., 2003).

3.5. AKUTNÍ VIROVÁ HEPATITIDA E

Virus hepatitidy E (HEV) je neobalený RNA virus o průměru 27-34 nm. Byl původně zařazen do čeledi *Caliciviridae*, ale organizace jeho genomu je odlišná od ostatních kalicivirů, takže nyní bývá HEV uváděn jako taxonomicky nezařazený virus. Je podobný některým virům rostlin a viru rubeoly. Známe je pouze jeden sérotyp HEV, ale čtyři hlavní lidské genotypy. Genotyp I je pravděpodobně africkým subtypem, genotyp II je znám z USA, genotyp III z Mexika a genotyp IV z Číny. Virus hepatitidy E způsobuje epidemie i sporadická onemocnění v rozvojových zemích. V České republice přichází hepatitida E v úvahu především jako importovaná nákaza, které zatím nelze předcházet vakcinací. Od roku 1998 do roku 2002 bylo v České republice hlášeno 59 případů hepatitidy E. Onemocnění nepřechází do chronicity. Velmi nebezpečné je onemocnění u těhotných žen, kde se udává více než 20 % letalita. Inkubační doba 15-60 dní, většinou kolem 40 dní (Husa, 2005).

Ikterický průběh onemocnění je pro HEV typický. Setkáváme se s ním u naprosté většiny dospělých pacientů. U 20-25 % dospělých jde o vysloveně cholestatický průběh onemocnění s velmi výrazným ikterem a svěděním kůže. Ikterus většinou ustupuje během 6 týdnů. U fulminantních forem onemocnění je ikterus pravidlem (Ehrmann a kol., 2003).

3.6. AKUTNÍ VIROVÁ HEPATITIDA G

Virus hepatitidy G (HGV) je zatím posledním virem, který se řadí mezi původce virových hepatitid. V roce 1995 se podařilo vyklonovat genetický materiál dvou virů, které byly nazvány HGVB-C a HGV. Jedná se o identické viry. Virus hepatitidy G je jednovláknový RNA virus. Jeho genom obsahuje 9392 nukleotidů, které kódují polyprotein o 2873 aminokyselinách. Patří mezi *Flaviviry* a je vzdáleně příbuzný HCV, s nímž má 26 % homologii sekvencí nukleotidů. Nestrukturní úseky genomu kódují helikázu, dvě proteázy a RNA-dependentní polymerázu. Přenáší se především parenterální cestou. Existují dva hraniční názory. První názor je založen na poznatku, že akutní hepatitida G je v podstatě vždy velmi mírná, asymptomatická a při dokumentované dlouhodobé pozitivitě markerů infekce HGV jsou biochemické a histologické nálezy často zcela normální (HGV není hepatotropní agens). Druhý názor předpokládá, že HGV může být původcem i fulminantní hepatitidy, neboť někteří autoři prokázali známky infekce HGV u řady pacientů s fulminantními hepatitidami, při absenci známek infekce jinými možnými původci. To by ukazovalo naopak na výraznou agresivitu viru vůči jaterním buňkám. Inkubační doba není zatím přesně známá, ale pravděpodobně bude podobná jako u HCV. Význam infekce HGV nebyl zatím definitivně zhodnocen (Husa, 2005).

3.7. CHRONICKÉ HEPATITIDY

Chronické hepatitidy jsou zánětlivá onemocnění jater, která trvají bez známek zlepšení minimálně 6 měsíců. Jejich histologickým korelátem jsou chronické zánětlivě-nekrotické změny v játrech. Z etiologických faktorů je třeba jmenovat viry hepatitidy B, C, D a s jistými výhradami i G a TTV, dále autoimunitní poškození a toxický vliv léků a jiných xenobiotik (Horák a Stříteský, 1999).

3.7.1. CHRONICKÁ HEPATITIDA B

U nemocného infikovaného „divokým“ typem viru přetrvává pozitivita HBsAg, HBeAg a HBV DNA v séru spolu se středně až výrazně zvýšenou aktivitou aminotransferáz. V této fázi probíhá aktivní virová replikace, vyvíjí se jaterní postižení a nemocný je silně infekční. V následující fázi integrace je genom HBV integrován do genomu hostitele, dochází k sérokonverzi HBeAg do anti-HBe, vymizí HBV DNA ze séra, aktivita aminotransferáz klesá nebo se zcela normalizuje a intenzita jaterního zánětu se v histologickém obraze snižuje. Dojde-li k reaktivaci onemocnění, obnovuje se virová replikace a v séru se znovu objevuje HBeAg a HBV DNA. Ve fázi integrace virová replikace na velmi nízké úrovni stále přetrvává (Ehrmann a kol, 2003).

S určitým zjednodušením lze chronickou HBV rozdělit do dvou různě klinicky závažných kategorií, a to nosičství HBsAg a chronická hepatitida B s pokračující virovou replikací. Nosičství HBsAg je příznivější, kdy nemocný má v séru pozitivní HBsAg a anti-HBe (HBeAg a HBV DNA jsou negativní), aktivita ALT je většinou normální nebo jen mírně zvýšená a histologický nálezn je také většinou téměř normální. K tomuto stavu dochází buď spontánně, nebo po antivirové terapii. Infekce se může reaktivovat, zvláště při imunopresi, a virová replikace se obnovuje. Chronická hepatitida B s pokračující virovou replikací se od akutní HBV liší jen nepřítomností protilátek anti-HBc IgM. Přetrvává HBsAg, HBeAg a HBV DNA pozitivita, elevace ALT a jsou významné zánětlivé a později i fibrotické změny v jaterním histologickém nálezu. Jde o mnohem nepříznivější situaci, protože při vysoké aktivitě procesu se může vyvinout jaterní cirhóza již během 4-5 let (Ehrmann a kol., 2003).

V oblastech s nízkou prevalencí infekce HBV (včetně České republiky) má jen 30 – 50 % pacientů s chronickou HBV v anamnéze akutní HBV. U ostatních je nemoc diagnostikována až v chronickém stádiu. Průběh chronické hepatitidy B může být zcela

asymptomatický nebo pod obrazem jen nespecifických symptomů, jako jsou únava a mírné tlaky v pravém epigastriu. Poměrně časté jsou akutní exacerbace chronické HBV provázené symptomy akutní hepatitidy (nechutenství, kloubní potíže apod.) a laboratorně charakterizované výrazným vzestupem aminotransferáz (Horák a Stříteský, 1999).

Se vzestupem sérových hladin bilirubinu se můžeme občas setkat v období akutních exacerbací chronické hepatitidy, i když častěji dochází pouze ke vzestupu ALT, AST a ikterus nevzniká. V pokročilých stádiích choroby (tj. jaterní cirhóza, hepatocelulární karcinom) se objeví žloutenka, stejně jako při jiných příčinách uvedených stavů (Ehrmann a kol., 2003).

3.7.2. CHRONICKÁ HEPATITIDA C

Pravděpodobnost přechodu infekce do chronicity u tohoto typu hepatitidy je vysoká. Většinou se v literatuře udává mezi 70-90 %. Naprostá většina nemocných se tedy z akutní hepatitidy nevyлéčí, ale přejde do chronického stádia. Spontánní vymizení virové replikace je u chronické hepatitidy C krajně nepravděpodobné, proto onemocnění velmi pozvolna progreduje ze stádia chronické hepatitidy do jaterní cirhózy. Během 10 až 20 let vznikne cirhóza zhruba u 20 % nemocných s chronickou HCV. Rychlost progresu do cirhózy je ovlivněna věkem, abúzem alkoholu a případně koinfekcí s HBV či HIV. Hepatocelulární karcinom vzniká ročně u 1-4 % nemocných s jaterní cirhózou. U pacientů bez cirhózy je výskyt rakoviny jater jen výjimečný (Ehrmann a kol., 2003).

Infekce HCV je v naprosté většině případů diagnostikována až ve stadiu chronické hepatitidy, nezřídka dokonce až jaterní cirhózy nebo hepatocelulárního karcinomu. Chronická HCV a často i jaterní cirhóza probíhají většinou asymptomaticky a jsou odhaleny převážně náhodou při preventivních prohlídkách nebo při vyšetřeních zaměřených na jiná onemocnění, většinou po mnoha letech od infikování. Pokud je chronická HCV symptomatická, projevuje se nespecifickými projevy, jako jsou únava a pobolívání kloubů. Teprve dekompenzovaná jaterní cirhóza a hepatocelulární karcinom se výrazněji klinicky manifestují. Poměrně často se objevují extrahepatální projevy onemocnění. U 36-45 % nemocných lze v séru prokázat kryoglobuliny (tato esenciální smíšená kryoglobulinémie se manifestuje purpurou, slabostí a neuropatiemi) (Horák a Stříteský, 1999).

V případě chronické hepatitidy C přetrvávají v séru protilátky anti-HCV a je pozitivní nukleová kyselina viru (HCV RNA). Sérová aktivita ALT bývá ve většině

případů zvýšená na dvojnásobek až pětinasobek horní hranice normy. Vyšší elevace aminotransferáz je prokazatelná jen u malé části nemocných. Ikterus se objevuje až při jaterní cirhóze nebo hepatocelulárního karcinomu (Zima, 2007).

3.8. MOŽNOST OPAKOVANÉHO ONEMOCNĚNÍ VIROVOU HEPATITIDOU

Imunita po prodělané virové hepatitidě určitého typu nechrání před infekcí jiným původcem virových hepatitid. Proto může člověk onemocnět postupně všemi typy virových hepatitid, teoreticky vzato i všemi typy naráz. Virus hepatitidy C se navíc vyskytuje v několika různých subtypech a současná infekce dvěma subtypy viru je možná. Po proběhlé hepatitidě E nepřetrvávají většinou protilátky trvale, nová infekce tímto virem je pravděpodobně možná. Tato reinfekce podle některých zpráv může mít i horší průběh než první onemocnění. Problém zatím není definitivně vyřešen (Husa, 2005).

Tab. 2 – Základní charakteristiky virových hepatitid

	HAV	HBV	HCV	HDV	HEV	HGV
Čeď	Picornaviridae	Hepadnaviridae	Flaviviridae	Deltaviridae	nezařazený	Flaviviridae
Genom	RNA	DNA	RNA	RNA	RNA	RNA
Velikost (nm)	27-33	42	30-80	35	27-34	neuvedeno
Chronicita	ne	ano	ano	ano	ne	ano
Přenos	fekálně-orální	krev, sliny	krev, sliny	krev	fekálně-orální	
Inkubační doba (dny)	15-45	30-180	15-150	30-180	15-60	neuvedeno
Imunologické markery	anti-HAV IgM, anti-HAV celkové	anti-HBc IgM, HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBeAg, HBV DNA	anti-HCV IgG, HCV RNA	anti-HDV IgM	anti-HEV IgM	HGV RNA
Ikterus	Bilirubin, ALT, AST	Bilirubin, ALT	ALT	Bilirubin, ALT	Bilirubin	ALT

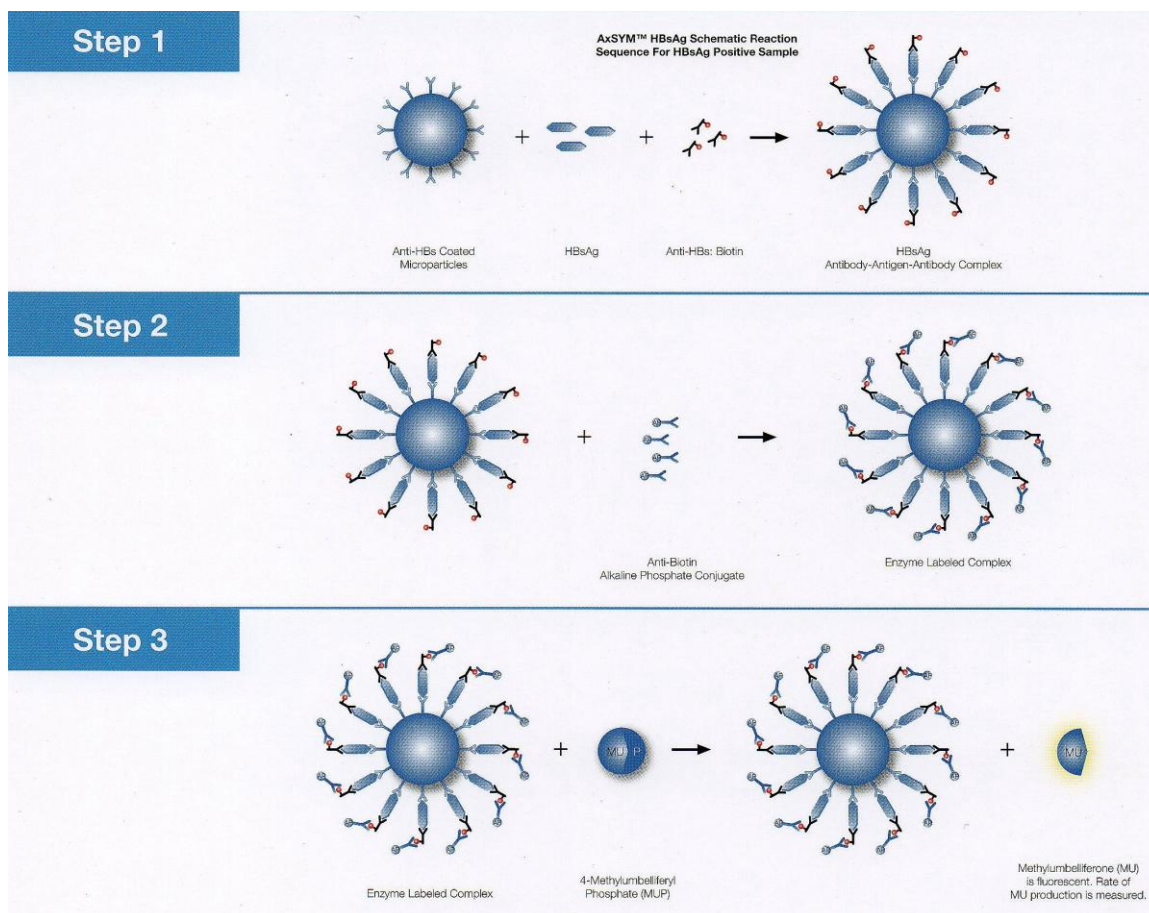
4. DIAGNOSTIKA VIROVÝCH HEPATITID

Virové hepatitidy v současné době představují jednu z nejčastějších příčin akutního a chronického onemocnění jater. Přesná klasifikace stádia onemocnění je nezbytnou podmínkou úspěšné léčby. Diagnostika je dnes opřena o kombinaci imunologických a molekulárně genetických metod (Zima, 2007).

4.1. IMUNOLOGICKÉ METODY

4.1.1. ENZYMOVÁ IMUNOANALÝZA NA MIKROČÁSTICÍCH (MEIA)

Technologie MEIA je založena na reakci antigenu s protilátkou. Využívá k měření analytů roztok suspendovaných submikronových latexových částic. Tyto částice jsou potaženy záchytovými molekulami specifickými pro měřený analyt. Účinný povrch mikročástic zvyšuje kinetiku metody a snižuje dobu inkubace. Metody MEIA tedy trvají kratší dobu než jiné imunoanalýzy. V centru pro zpracování vzorků se vzorek a reagentie pro jednu metodu přenesou do reakční nádoby. Reakční nádoba se přenesou do procesního centra, kde se reagentie a vzorek inkubují, aby dosáhly reakční teploty. Vzorek se smíchá s reagentiemi a vzniklá reakční směs se přenesou na inertní skleněná vlákna matrice. Díky ireverzibilní vazbě mikročástic je imunokomplex zachycen na skleněných vláknech matrice, zatímco reakční směs rychle proteče velkými póry v matrici. Na skleněná vlákna matrice se přidá konjugát s alkalickou fofátázou a 4-methylumbelliferylfosfátu (MUP). Konjugát katalyzuje hydrolýzu MUP na methylumbelliferon (MU). Naměřená hodnota fluorescenčního MU vytvořeného na matrici je přímo úměrná koncentraci analytu v testovaném vzorku, viz. obr. 6 (Anonym, 2004).



Obr. 6 – Průběh stanovení antigenu HBsAg (Anonym, 2004)

4.1.2. IMUNOANALÝZA VYUŽÍVAJÍCÍ FLUORESCENČNÍ POLARIZACI (FPIA)

Imunoanalýzy využívající fluorescenční polarizaci kombinují při stanovení koncentrace analytu kompetitivní reakci a fluorescenční polarizaci.

Kompetitivní vazba vyžaduje dva antigenní (analytické) systémy: analyt ze vzorku a analyt značený fluorescenčním indikátorem, který je součástí reagensů metody. Analyt ze vzorku soutěží s analytem značeným indikátorem o vazebná místa na protilátce. Jednotlivé analytické systémy se naváží na vazebná místa v závislosti na příslušné relativní koncentraci. Při vysoké koncentraci analytu ve vzorku se na protilátky naváže více analytu ze vzorku, zatímco analyt značený indikátorem se nenačká. Při nízké koncentraci analytu ve vzorku se na protilátky naváže méně analytu ze vzorku a více analytu značeného indikátorem (Anonym, 2004).

Polarizované záření se používá k tvorbě polarizovaného fluorescenčního záření emitovaného z indikátoru, kterým je značený analyt. Průměrná hodnota polarizace emitované fluorescence je úměrná rychlosti rotace molekuly. Rychlost rotace molekul v kapalině je úměrná velikosti molekuly. Malé, nenavázané analyty rotují rychleji než větší komplex analyt-protilátka. Analyzátor měří změnu v polarizaci emitované fluorescence po vytvoření komplexu analyt-protilátka (Anonym, 2004).

4.1.3. REKOMBINANTNÍ IMUNOBLOTOVÁ ANALÝZA (RIBA)

Metoda rekombinantního imunoblotu (RIBA) stanovuje reaktivitu séra vůči peptidům specifickým pro VHC (Zima, 2007).

V rekombinantním imunoblotu RIBA-1 (Ortho) je užíván rekombinantní antigen c100 exprimovaný v kvasničných buňkách (jako je to v testu ELISA) a protein 5-1-1 exprimovaný v *E. coli* (5-1-1 je menší část c100-3). Oba antigeny jsou na nitrocelulózovém nosiči uspořádány v prouzcích. Reaktivní, hraniční nebo negativní výsledek je odečítán porovnáním barevného odstínu antigenního pruhu s pozitivními kontrolami. Pomocí RIBA-1 lze odlišit infekční a neinfekční dárce krve (Stránský, 1999).

V rekombinantním imunoblotu RIBA-2 jsou obsaženy známé proteiny 5-1-1 a c100-3 z oblasti NS4 a rekombinantní proteiny c33c (z NS3) a c22-3 (z oblasti core). První zkušenosti s metodou RIBA-2 prokázaly dobrou korelaci s testem ELISA, aktivitou ALT a jen 11 % vzorků zůstalo neurčitých v RIBA-2. RIBA-2 je nejdůležitější rutinní konfirmační test u všech pacientů, kteří mají reaktivitu v testu ELISA. U dárců s neurčitým výsledkem v RIBA-2 lze také použít suplementační test InnoLIA firmy Innogenetics, využívající syntetické peptidy. Při kombinovaném vyšetření různými soupravami zůstane neurčitých jen asi 15 % vzorků, ostatní jsou buď pozitivní, nebo negativní (Stránský, 1999).

Imunoblot RIBA-3 Ortho obsahuje dva rekombinantní antigeny (c33 a jeden odvozený z NS5) a dva syntetické peptidy: z nukleokapsidy (c22) a z oblasti NS4 (c100) genomu HCV. Test byl vyzkoušen ve skupině 20 EIA-2 reaktivních a RIBA-2 neurčitých vzorků od narkomanů a mužských homosexuálů. Všechny vzorky reagovaly v RIBA-3 nejméně se dvěma pruhy. Nový konfirmační imunoblot RIBA-3 prokázal, že většina neurčitých vzorků ve vysoce rizikových populacích, byla skutečně infikována HCV (Stránský, 1999).

Při porovnání konfirmačních testů RIBA-2 a RIBA-3 bylo zjištěno, že diagnostický přínos spočívá v eliminaci falešně pozitivních reakcí s c22-3 a c100-3. V testu RIBA-3

může být také výsledkem neurčitý, v tomto případě je třeba pátrat po jaterním onemocnění a vyšetřit HCV RNA, protože téměř 60 % jedinců s takovým nálezem je infikováno HCV (Stránský, 1999).

4.2. MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ METODY

4.2.1. POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

Testy ELISA a RIBA zjišťují pouze přítomnost protilátek proti proteinům HCV, ale neumožňují posoudit replikaci HCV. Na počátku onemocnění je období 6-8 týdnů, v němž lze infekci HCV prokázat pouze stanovením HCV RNA v séru anebo v játrech při použití technik polymerázové řetězové reakce (PCR) (Stránský, 1999).

PCR je známa od roku 1985. Jejím principem je reverzní transkripce virové RNA (izolované ze vzorku) na cDNA, načež se provede selektivní zesílení virové cDNA (tzv. amplifikace). Produkt PCR amplifikace je pak separován gelovou elektroforézou a pruhy DNA jsou identifikovány buď obarvením pomocí ethidium bromidu pro zviditelnění v UV světle nebo vizualizací pomocí specifické hybridizační sondy (Stránský, 1999).

Technika PCR má několik výhod: vyžaduje pouze malé množství materiálu (sérum nebo tkáň), zesílení je obecně velmi výkonné (10^6 - 10^9 krát), stanovení je poměrně rychlé, vyžaduje 2 - 3 dny (Stránský, 1999).

Významné je, že amplifikovaná nukleová kyselina může být i klonována a nebo sekvenována a dovoluje přesnou charakterizaci HCV. PCR může být použita pro zjištění HCV RNA v séru, játrech a v mononukleárech periferní krve. Účinnost detekce je závislá na odběru a skladování vzorků, množství dostupného materiálu a na užití specifických primerů (syntetických oligonukleotidů). PCR umožňuje přímý průkaz viremie HCV. U akutní infekce lze prokázat virémii HCV za 1 týden po nákaze. Většina anti-HCV pozitivních pacientů s chronickou hepatitidou má prokazatelnou HCV RNA v séru. Pozitivní a negativní vlákna HCV RNA byla také nalezena v mononukleárech periferní krve, což svědčí o tom, že HCV infikuje krevní elementy bílé řad. V hepatologii je PCR nepostradatelná pro analýzu virových infekcí (Stránský, 1999).

PCR se uplatňuje při analýze genetické variability HCV. Hlavní klinické indikace PCR u infekce HCV jsou následující:

- diagnostika akutní infekce HCV,
- anti-HCV negativní pacient s chronickou hepatitidou,
- průkaz virémie u bezpříznakových dárců krve s normální aktivitou ALT,
- diagnóza anti-HCV pozitivní chronické hepatitidy s protilátkou anti-LKM (mikrosomální protilátka játra-ledvina),
- rozhodnutí, zda léčit nebo neléčit nemocného interferonem,
- hodnocení infekce HCV po transplantacích orgánů, především jater a ledvin,
- vyšetření přenosu HCV z matky na dítě,
- kontrola protivirové léčby (Stránský, 1999).

Technika PCR je v současné době nejcitlivější metodou k průkazu HCV RNA. Výběr primerů z nekódující 5'-oblasti vedl k podstatnému zlepšení senzitivity testu. Přes četné výhody je rutinní užití PCR omezeno, a to jak výkonem samotným (jeho cenou a efektivitou), tak interpretací výsledků. Stanovení virové RNA je v současné době „zlatým standardem“ diagnostiky infekce HCV, přestože se i u této metody mohou vyskytnout falešně pozitivní i negativní výsledky. V každém případě by měly být výsledky testů PCR posuzovány společně se všemi klinickými, biochemickými a histologickými nálezy. U nás je nejrozšířenější souprava Amplicor HCV firmy ROCHE, která poskytuje spolehlivé výsledky (Zima, 2007).

4.3. IMUNOLOGICKÉ MARKERY

4.3.1. Protilátky anti-HAV IgM

Protilátky anti-HAV IgM se stanovují metodou AxSYM HAVAB-M 2.0. Jde o MEIA metodu ke kvalitativní detekci protilátek proti viru hepatitidy A třídy IgM v lidském séru nebo plazmě. Při této metodě se protilátky anti-HAV třídy IgM ve vzorku séra či plazmy přímo váží s kozími protilátkami proti lidskému IgM navázaného na mikročasticích. Po té se přidá roztok s lidským virem HAV a dochází k reakci antigenu lidského viru hepatitidy A v roztoku s protilátkami anti-HAV třídy IgM navázanými na mikročasticích, čímž vznikne komplex protilátka-antigen. Detekce imunokomplexu tvořeného protilátkami anti-HAV se provádí přidáním konjugátu myších monoklonálních protilátek anti-HAV s alkalickou fosfatázou, který se naváže na komplex protilátka-antigen na mikročasticích, čímž vznikne komplex protilátka-antigen-protilátka. Promytím se odstraní nevyvázaný materiál a přidá se substrát (MUP). Přítomnost či nepřítomnost protilátek ve vzorku se určuje na základě porovnání rychlosti tvorby fluorescenčního produktu s průměrnou hodnotou reakční rychlosti indexového kalibrátoru, která je vypočtena na základě dříve provedené indexové kalibrace metody. Vzorky s hodnotami indexu vyššími než 1,20 jsou považovány za reaktivní a s hodnotami nižšími než 0,80 za nereaktivní na protilátky anti-HAV IgM. Hodnota indexu se vypočte pro každý vzorek a kontrolu na základě reakční rychlosti vzorku a průměrné hodnoty reakční rychlosti indexového kalibrátoru (Anonym, 2004).

4.3.2. Celkové protilátky anti-HAV

Celkové protilátky anti-HAV (třídy IgM a IgG) se stanovují metodou AxSYM HAVAB 2.0. Metoda je založena na technologii MEIA a využívá principu kompetitivní vazby protilátek anti-HAV obsažených v séru či plazmě a lidských protilátek anti-HAV v konjugátu s alkalickou fosfatázou na antigen HAV na mikročasticích. Přítomnost či nepřítomnost protilátek anti-HAV v séru či plazmě se určuje na základě porovnání rychlosti tvorby fluorescenčního produktu s hodnotou cutoff, která je vypočtena na základě dříve provedené indexové kalibrace metody. Je-li rychlost tvorby fluorescenčního produktu v testovaném vzorku nižší nebo rovna hodnotě cutoff, je vzorek považován za reaktivní na celkové protilátka anti-HAV. Vzorky s hodnotami S/CO (S/CO vyjadřuje poměr mezi reakční rychlostí vzorku a hodnotou cutoff) v rozmezí 0,000 – 1,000 jsou považovány za reaktivní (Anonym, 2004).

4.3.3. Antigen HBsAg

Antigen HBsAg se stanovuje metodou AxSYM HBsAg. Jde o enzymovou imunoanalýzu na mikročasticích třetí generace ke kvalitativní detekci povrchového antigenu viru hepatitidy B v lidském séru nebo plazmě.

Reakce probíhá v následujícím pořadí: Do reakční jamky se napipetuje sérum nebo plazma a mikročastice potažené monoklonálními protilátkami anti-HBs. Pokud je ve vzorku přítomen HBsAg, naváže se na protilátky anti-HBs na mikročasticích a po přidání roztoku s protilátkami anti-HBs značenými biotinem se v reakční směsi vytvoří komplex protilátka-antigen-protilátka. Část reakční směsi se přenesse do reakční matrice. Zde se mikročastice ireverzibilně váží na skleněná vlákna matrice. Do reakční matrice se přenesse konjugát anti-biotinových protilátek s alkalickou fosfatázou, který se naváže na komplex na mikročasticích. Reakční matrice se promyje, aby se odstranil materiál nenavázaný na mikročastice. Přidá se substrát 4-methylumbelliferylfosfát (MUP). Alkalická fosfatáza, kterou je značený konjugát, katalyzuje odštěpení fosfátové skupiny ze substrátu za tvorby fluorescenčního produktu 4-methylumbelliferonu (viz. obr. 6). Tento fluorescenční produkt se měří optickým systémem MEIA. Vzorky s hodnotami S/CO vyššími nebo rovnými 1,00 jsou považovány za reaktivní (Anonym, 2004).

4.3.4. Protilátky anti-HBs

Protilátky anti-HBs se stanovují metodou AxSYM AUSAB, která je založena na enzymové imunoanalýze na mikročasticích ke kvantitativnímu stanovení protilátek proti povrchovému antigenu viru hepatitidy B (anti-HBs) v lidském séru nebo plazmě (princip reakce jako u stanovení HBsAg). Koncentrace protilátek anti-HBs se stanoví na základě předem sestrojené kalibrační křivky. Je-li koncentrace vzorku vyšší nebo rovna 10,0 IU/ml, je vzorek považován za reaktivní na protilátky anti-HBs (Anonym, 2004).

4.3.5. Protilátky anti-HBc IgM

Protilátky anti-HBc IgM se stanovují metodou AxSYM CORE-M. Jde o enzymovou imunoanalýzu na mikročasticích ke kvalitativnímu stanovení protilátek třídy IgM proti core antigenu viru hepatitidy B (anti-HBc IgM) v lidském séru či plazmě.

Do reakční matrice se nadávkuje mikročastice potažené kozími protilátkami proti lidskému IgM. Zde se mikročastice ireverzibilně váží na skleněná vlákna matrice. Do reakční matrice se nadávkuje vzorek séra nebo plazmy zředěný roztokem na ředění vzorků. Protilátky třídy IgM přítomné ve vzorku se naváží na mikročastice potažené

kozími protilátkami proti lidskému IgM. Reakční matrice se promyje, aby se odstranil nenavázaný materiál. Dále s přidá core antigen viru hepatitidy B se naváže na všechny protilátky anti-HBc třídy IgM přítomné ve vzorku, které se navázaly na mikročástice, čímž vznikne komplex protilátka-antigen. Do reakční matrice se nadávkuje konjugát lidských protilátek proti core antigenu viru hepatitidy B s alkalickou fosfatázou, který se naváže na komplex na mikročásticích. Reakční matrice se promyje. Přidá se substrát (MUP). Vzniká fluorescenční produkt, který se měří optickým systémem MEIA. Vzorky s hodnotami indexu vyššími než 1,20 jsou považovány za reaktivní na protilátky anti-HBc třídy IgM (Anonym, 2004).

4.3.6. Protilátky anti-HBc (IgG a IgM)

Protilátky anti-HBc (IgG a IgM) se stanovují metodou AxSYM Core, což je enzymová imunoanalýza na mikročásticích ke kvalitativní detekci protilátek proti core antigenu viru hepatitidy B (anti-HBc) v lidském séru nebo plazmě. Tato metoda k detekci protilátek anti-HBc používá mikročástice potažené rekombinantním core antigenem viru hepatitidy B (rHBcAg). Vzorky s hodnotami S/CO v rozmezí 0,000 až 1,000 jsou podle kritérií metody AxSYM považovány za reaktivní (Anonym, 2004).

4.3.7. Antigen HBeAg

Antigen HBeAg se stanovuje metodou AxSYM HBe 2.0. Je to enzymová imunoanalýza na mikročásticích ke kvalitativní detekci antigenu „e“ viru hepatitidy B v lidském séru nebo plazmě. Využívá principu přímé vazby HBeAg ve vzorku na protilátky anti-HBe na mikročásticích. Navázaný HBeAg je poté detekován konjugátem protilátek anti-HBe s alkalickou fosfatázou. Vzorky s hodnotami S/CO vyššími nebo rovnými 1,00 jsou podle kritérií metody považovány za reaktivní (Anonym, 2004).

4.3.8. Protilátky anti-HBe

Protilátky anti-HBe se stanovují metodou AxSYM Anti-HBe, což je enzymová imunoanalýza na mikročásticích ke kvalitativní detekci protilátek proti antigenu „e“ viru hepatitidy B v lidském séru nebo plazmě. Je založena na principu kompetitivní vazby mezi protilátkami anti-HBe ve vzorku, protilátkami anti-HBe na mikročásticích a protilátkami anti-HBe konjugovanými s alkalickou fosfatázou v prostředí standardizovaném množstvím neutralizující reagentie (HBeAg připravený z rekombinantní DNA–rHBeAg). Vzorky

s hodnotami S/CO nižšími nebo rovnými 1,000 jsou považovány za reaktivní (Anonym, 2004).

4.3.9. Stanovení HBV DNA

Polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) – je nejcitlivější a nejspecifičtější metodou stanovení HBV DNA. V modifikované podobě ji lze použít i pro kvantitativní stanovení. Umožňuje stanovení i velmi nízkých titrů 10-100 IU/ml.

Molekulární hybridizace bez amplifikace nebo s amplifikací založenou na technologii rozvětvené DNA (Quantiplex HBV DNA, Chiron Diagnostics). Jsou používány pouze ke kvantitativnímu stanovení, neboť klasická kvalitativní PCR je podstatně citlivější (klinicky významná virémie = 10^5 IU/ml);

Stanovení HBV DNA metodou ligázové řetězové reakce – osvědčuje se při průkazu pre-core mutant, senzitivita v porovnání s PCR je nízká (Zima, 2002).

4.3.10. Protilátky anti-HCV

Protilátky anti-HCV se nejčastěji stanovují metodou HCV EIA 3.0 firmy Abbott. Jedná se o enzymovou imunoanalýzu na mikročasticích ke kvalitativní detekci protilátek proti viru hepatitidy C (anti-HCV) v lidském séru nebo plazmě. Zjišťuje protilátky ke čtyřem rekombinantním proteinům HCV: strukturnímu HC-34 (z oblasti core), HC-43 (z oblasti core a NS3), c100-3 (z oblasti NS4) a NS5. Vzorky s hodnotami S/CO vyššími nebo rovnými 1,00 jsou považovány za reaktivní (Anonym, 2004; Zima, 2007).

Dále soupravy: Monolisa anti-HCV firmy Sanofi Diagnostics Pasteur obsahuje dva rekombinantní proteiny odpovídající části oblasti NS3 a NS4 a dva peptidy odpovídající genomu kapsidové oblasti HCV. UBI HCV EIA 4.0 využívá syntetické peptidy nesoucí imunodominantní epitopy core, NS3, NS4 a NS5 oblasti HCV (Stránský, 1999).

4.3.11. Genotypizace HCV

Z pohledu rizika progresu onemocnění a pravděpodobnosti odpovědi na interferon je významné určení genotypizace HCV. Jednotlivé genotypy HCV lze stanovit polymerázovou řetězovou reakcí s typově specifickými primery odvozenými z core oblasti genomu HCV. Jinou možností je použití sond imobilizovaných na nitrocelulóзовé membráně a analýza polymorfismu délky restrikčních fragmentů (RFLP). Nejjednodušším průkazem je alternativní stanovení sérotypů s použitím specifických protilátek metodou

ELISA. V Evropě a USA je dominující genotyp 1 (74 %) s přibližně rovnoměrným zastoupením podtypu 1a a 1b, genotyp 2 je přítomen asi ve 2-15 %, genotyp 3 se vyskytuje v 6 % a genotyp 4 v 1 %. U některých nemocných je možno prokázat infekci několika genotypy (Zima, 2007).

4.3.12. Průkaz hepatitidy D

Pro adekvátní diagnostiku infekce HDV je nutné vyšetření HBsAg (viz. kap.3.3.3.), anti-HBc IgM (viz. kap.3.3.5.) a celkové anti-HDV protilátky. Ve specializovaných laboratořích se provádí i průkaz antigenu hepatitidy D (HDAg), který se v séru objevuje především v akutní fázi hepatitidy, a nukleové kyseliny viru (HDV RNA), jejichž přítomnost v séru je časným a citlivým ukazatelem jak akutní, tak i chronické hepatitidy D (Zima, 2007).

4.3.13. Průkaz hepatitidy E

Diagnóza hepatitidy E je založena na průkazu protilátek anti-HEV. V zemích, kde se hepatitida E nevyskytuje endemicky, je třeba hodnotit pozitivitu protilátek anti-HEV s velkou opatrností. Některé používané diagnostické testy mohou být málo specifické a falešně pozitivní výsledky jsou běžné.

Sérologické testy prokazují přítomnost IgM anti-HEV, anti-HEV protilátky (protilátky proti antigenu ORF2) (Zima, 2007).

4.3.14. Průkaz hepatitidy G

Až do roku 1998 byla jedinou možností průkazu HGV detekce ribonukleové kyseliny viru (HGV RNA) pomocí polymerázové řetězové reakce. Od té doby je možný i průkaz protilátek proti obalovému proteinu (E2) viru hepatitidy G. Tyto protilátky se objevují až po vymizení HGV RNA ze séra a ukazují na překonanou infekci HGV. Zachycení současné positivity HGV RNA a anti-HGV je velmi málo pravděpodobné, protože existuje jen ve velmi krátkém období (Husa, 2005).

5. HEPATÁLNÍ IKTERUS

Příčinou hepatálního ikteru je hepatocelulární postižení. Dochází k porušení nejen konjugace, ale i vylučování konjugovaného bilirubinu na žlučovém pólu hepatocytu, proto stoupá bilirubin konjugovaný, ale i nekonjugovaný. Je projevem metabolické nedostatečnosti při difúzním poškození jater u řady chorob s velmi pestrým klinickým a laboratorním nálezem. Může se jednat o poškození při akutních onemocněních či ve fázi jaterní insuficience anebo o selhání při chronických jaterních chorobách (Ehrmann a kol., 2003).

Bilirubin je organický anion vznikající po rozpadu červených krvinek a při degradaci hemoglobinu. Malá část hemu pochází z myoglobinu a cytochromů. Denně se vytvoří 250-350 mg bilirubinu. Po odstranění železa a otevření porfyrinového kruhu vzniká jako první zelený pigment biliverdin, který je následně redukován na bilirubin. Uvolněný bilirubin je transportován do jater vázaný na albumin. Transport jaterní buňkou je uskutečněn specifickým přenašečovým systémem a v játrech je bilirubin před exkrecí konjugován UDP-glukuronosyltransferázou s kyselinou glukuronovou. Vzniklý bilirubin diglukuronid je aktivním přenašečovým systémem vylučován do žluči a dále do trávicího ústrojí, kde je bakteriální mikroflórou nekonjugován na nekonjugovaný bilirubin a následně redukován na celou řadu produktů, souborně nazývaných urobilinoidy. Z nich mezi nejznámější patří urobilinogen a sterkobilinogen a jejich oxidační deriváty urobilin, respektive sterkobilin (Zima, 2007).

Koncentrace bilirubinu v séru je měřena fotometricky jako azoderivát vznikající při Van den Bergově reakci. Podle průběhu této reakce dělíme bilirubin na dvě frakce: ve vodě rozpustný (konjugovaný bilirubin) a v tucích rozpustný (nekonjugovaný bilirubin) (Zima, 2007).

Bilirubin se snadno váže k elastické tkáni. Kůže, oční skléra a krevní cévy mají vysoký obsah elastické tkáně a snadno se stávají ikterickými. To také vysvětluje nesoulad mezi intenzitou žloutenky kůže a hladinami bilirubinu v séru během rekonvalescence po hepatitidě a cholestáze. Bilirubin se objevuje v moči před nástupem ikteru. Později vymizí, i když hodnoty v séru zůstávají zvýšené. Urobilinogen v moči se nachází v pozdní preikterické fázi. Hodnoty celkového bilirubinu v séru kolísají v širokém rozmezí (Sherlocková a kol, 2004).

Pro kvantitativní stanovení nekonjugovaného bilirubinu v séru nebo plazmě dospělých a novorozenců se používá Diazo-metoda systému COBAS INTEGRA. Celkový

bilirubin se v přítomnosti vhodného solubilizačního činidla spojuje s diazoniovými ionty v silně kyselém prostředí a vytváří azobilirubin. Intenzita zabarvení vytvořeného azobilirubinu je přímo úměrná koncentraci celkového bilirubinu a může být změřena fotometricky. Fyziologické hodnoty celkového bilirubinu u dospělých jsou do 17,1 $\mu\text{mol/}$ (Internet 2).

Konjugovaný bilirubin a δ -bilirubin, označovaný také jako přímý, reaguje přímo s diazotovanou kyselinou sulfanilovou v kyselém prostředí za vzniku červeného azobarviva. Intenzita zabarvení je přímo úměrná koncentraci konjugovanému bilirubinu v séru nebo plazmě a je měřen nárůst absorbance při 552 nm. Fyziologické hodnoty konjugovaného bilirubinu jsou do 3,4 $\mu\text{mol/l}$ (Internet 2).

6. ENZYMOVÁ VYŠETŘENÍ U VIROVÝCH HEPATITID

V oblasti testů prostupnosti a integrity membrán, které vypovídají o funkčním stavu a integritě celé jaterní buňky, se považuje stále za nejcitlivější a nejrychleji vypovídající stanovení aminotransferáz, především ALT. Vyšetření aminotransferáz v séru je užitečné pro časně stanovení diagnózy a pro zjištění anikterických případů. Zvýšení 3-20krát je typické pro akutní a chronické hepatitidy, toxické poškození jater nebo u srdečního selhání. (Ehrmann a kol., 2003; Zima, 2007).

Enzym aspartátaminotransferáza (AST) je široce rozšířený v mnoha tkáních, především však jater, srdce, svalů a ledvin. Zvýšené hladiny v séru jsou důsledkem poškození těchto tkání při onemocnění. Hepatobiliární choroby, jako jsou cirhóza, metastazující karcinom a virová hepatitida, rovněž zvyšují hladiny AST v séru (Internet 2).

Aspartátaminotransferáza se stanovuje metodou dle International Federation of Clinical Chemistry s pyridoxal-5-fofátem. AST katalyzuje přenos aminoskupiny mezi L-aspartátem a 2-oxoglutarátem za tvorby oxalacetátu a L-glutamátu. Oxalacetát, vytvořený reakcí, je redukován NADH v přítomnosti malátdehydrogenázy na L-malát a NAD^+ . Pyridoxal fosfát složí jako koenzym při přenosu aminoskupiny v reakci. Zajišťuje aktivaci enzymů. Rychlost oxidace NADH je přímo úměrná katalytické aktivitě AST. Stanovuje se měřením poklesu absorbance při 340 nm. Fyziologické hodnoty AST jsou u mužů 0,17 – 0,83 $\mu\text{kat/l}$ u žen 0,17 – 0,58 $\mu\text{kat/l}$ (Internet 2).

Enzym alaninaminotransferáza (ALT) je hojně přítomný v různých tkáních. Hlavním zdrojem ALT jsou játra, což vede ke stanovení aktivity ALT při diagnostice jaterních onemocnění. Zvýšené hodnoty se objevují při virové hepatitidě, cirhóze obstrukční žloutence, karcinomu jater a chronickém alkoholovém abusu (Internet 2).

Pro stanovení alaninaminotransferázy se používá metoda dle International Federation of Clinical Chemistry s pyridoxal-5-fosfátem. ALT katalyzuje reakci mezi L alaninem a 2-oxoglutarátem. Vytvořený pyruvát je pak redukován NADH v reakci katalyzované laktátdehydrogenázou na L-laktát a NAD^+ . Pyridoxal fosfát slouží jako koenzym při přenosu aminoskupiny v reakci. Zajišťuje úplnou aktivaci enzymů. Rychlost oxidace NADH je přímo úměrná katalytické aktivitě ALT. Stanovuje se měřením poklesu absorbance při 340 nm. Fyziologické hodnoty ALT jsou u mužů 0,17 – 0,83 $\mu\text{kat/l}$ a u žen 0,12 – 0,58 $\mu\text{kat/l}$ (Internet 2).

Gama-glutamyltransferáza (GGT) je membránově vázaný enzym přítomný v epitelových buňkách žlučových cest a vývodu pankreatu a v mikrotomech hepatocytu.

Je používán v diagnostice a monitorování hepatobiliárních onemocnění a také v souvislosti se skrytým alkoholizmem. Zvýšené aktivitu GGT v séru lze nalézt u pacientů, podstupujících dlouhodobou medikaci fenobarbitalu a fenytoinu (Hermann a kol.,2003).

Gama-glutamyltransferázu stanovujeme enzymatickým kolorimetrickým testem. GGT přenáší γ -glutamylovou skupinu L- γ -glutamyl-3-karboxy-4-nitronilidu na glycyglycin. Množství uvolněného 5-amino-2-nitrobenzoátu je přímo úměrné aktivitě GGT ve vzorku. Stanovuje se měřením nárůstu absorbance při 409 nm. Fyziologické hodnoty GGT jsou u mužů 0,17 – 1,10 μ kat/l a u žen 0,08 – 0,65 μ kat/l (Internet 2).

7. PREVENCE

7.1. OBECNÁ PREVENTIVNÍ OPATŘENÍ

Ze znalosti způsobů šíření infekce vyplývají určitá opatření a způsoby chování, kterými lze významně snížit riziko infikování. U hepatitid A a E je nejlepší prevencí dobrá komunální a osobní hygiena. Po stránce komunální je základním požadavkem zajištění zásobování obyvatelstva nezávadnou pitnou vodou a potravinami a hygienické odstraňování splašků. Z hlediska osobní hygieny je nutné dbát na důkladné umývání rukou, zejména po použití sociálních zařízení. Nároky na osobní hygienu se zvyšují v případě kontaktu s nemocným s hepatitidou a při cestách do zemí s nižším hygienickým standardem. V mnoha zemích existují značné rozdíly v ekonomické a hygienické úrovni mezi městy a venkovem, často stačí vycestovat jen několik kilometrů od metropole a člověk se ocitá v naprosto jiných podmínkách. Virus hepatitidy B se významně často přenáší sexuální cestou. Riziko infikování roste při promiskuitním chování či sexuálních aktivitách spojených s možností vzniku krvácení. Použitím prezervativu se nebezpečí přenosu infekce významně snižuje. Hepatitidu B lze přenést i společným používáním žiletek, zubních kartáčků či nůžek s jinými osobami (Husa, 2005).

Společné sdílení jehel a stříkaček mezi injekčními uživateli drog je v současnosti v rozvinutých zemích světa nejrizikovějším chováním pro přenos virových hepatitid. Mezi závislými se nejčastěji objevuje hepatitida C, ale ani hepatitidy A, B, D a G nejsou ničím neobvyklým. Hepatitida A se však nepřenáší krví, ale přímým či nepřímým kontaktem s výkaly nemocného člověka, při často nižším hygienickém standardu ve společnosti narkomanů. Používání nesterilních nástrojů při tetování a piercingu má pro šíření virových hepatitid B, C, D a G podobný význam jako půjčování jehel mezi narkomany. Ke snížení nebezpečí infikování zdravotníků a pacientů je nutné, aby pacient s chronickou hepatitidou oznámil tuto skutečnost lékaři před zákroky, při kterých je možnost přenosu infekce. Jedná se zejména o operační výkony, endoskopické vyšetřovací metody, odběry krve a stomatologická vyšetření. Je samozřejmostí, že tyto osoby jsou vyřazeny z dárcovství krve (Husa, 2005).

7.2. VAKCINACE VIROVÉ HEPATITIDY A

K aktivní imunizaci monovalentními vakcínami je u nás registrováno několik inaktivovaných očkovacích látek, které se používají ve dvoudávkovém schématu. Jsou to Havrix Junior Monodose, Havrix 1440, Avaxim, Vaqta Pediatric a Vaqta Adult. Již za 14 dnů po první dávce vzniká asi jeden rok trvající imunita. Druhá dávka (booster dávka neboli přeočkování) se aplikuje za 6 až 18 měsíců po první dávce (dle typu vakcíny a doporučení výrobce) a poskytne více než desetiletou ochranu před nákazou. Podle posledních výzkumů by ochranný účinek měl být dostatečný i po 15 až 20 letech od booster dávky. Například první dávka očkovací látky Havrix 1440 chrání již od 14. dne po aplikaci 96 % osob, 100 % osob je pak chráněno po 1. měsíci. Protektivní hladina, která chrání proti vzniku a rozvoji nemoci, musí být vyšší než 20 IU/ml. Prodělané onemocnění navozuje hladiny okolo 10 000 IU/ml a kompletní vakcinace okolo 5 000 IU/ml. Vedlejší účinky očkování jsou zanedbatelné. Kontraindikací očkování je akutní horečnaté onemocnění a přecitlivělost na některou složku vakcíny. Očkování poskytuje nejen osobní ochranu očkovanému, ale brání také importu nákazy do země s vysokým podílem vnímavých osob a v případě vakcinace dětí v rodině chrání též vnímavé rodinné příslušníky, kteří na rozdíl od dětí udržují vyšší hygienický standard (Beran, 2005).

7.3. VAKCINACE VIROVÉ HEPATITIDY B

K aktivní imunizaci virové hepatitidy B monovalentními vakcínami je u nás registrováno několik rekombinantních očkovacích látek, které se podávají v klasickém třídávkovém schématu (0, 1. 6. měsíc). Jsou to Engerix B, H-BVAX II a HBVAX PRO. Velké oblíbenosti doznala vakcína Engerix B, která se v České republice používá k vakcinaci nejen rizikových skupin, ale také pro pravidelné očkování novorozenců a dětí starších 12 let. Vakcíny jsou vcelku dobře snášeny, vedlejší účinky jsou málo časté a omezují se na lokální bolestivost a zarudnutí. Aplikují se intramuskulárně (Beran, 2005).

7.4. MOŽNOST DUÁLNÍ PROTEKCE PROTI VIROVÉ HEPATITIDĚ A, B

Mnoho osob i v naší populaci (cestovatelé, někteří zdravotničtí pracovníci, uživatelé i.v. aplikace drog, osoby onemocnělé HCV, a především pak naše děti při přechodu do adolescence) je ohroženo jak hepatitidou A, tak hepatitidou B. Tyto hepatitidy tvoří například více než 75 % virových hepatitid získaných během pobytu v zahraničí. Z důvodu kombinace rizika obou hepatitid u dospívajících dětí a dospělých je výhodné aplikovat kombinovanou očkovací látku proti HAV a HBV. Očkovací látka Twinrix je první dostupnou vakcínou na českém trhu se současně dvojitou ochranou jak proti virové hepatitidě A (HAV), tak i proti virové hepatitidě B (HBV). V České republice je registrována dvojitá síla vakcíny pod obchodními názvy Twinrix Adult a Twinrix Paediatric. Očkovací látka Twinrix je kombinací v současnosti ve světě velmi používaných monovalentních vakcín proti HAV (Havrix) a HBV (Engerix B).

Aplikace vakcíny se provádí intramuskulárně, nejčastěji do deltového svalu v třídávkovém schématu (0, 1. a 6. měsíc). Protektivní účinnost proti HAV nastává u 91 % očkovaných již po první dávce v 1. měsíci, po druhé dávce ve 2. měsíci je chráněno 100 % očkovaných. Zajímavý je rychlý nástup protektivní účinnosti proti HBV u vakcíny Twinrix. Již po první dávce v 1. měsíci je chráněno 69 % osob, po druhé dávce ve 2. měsíci je chráněno 98 % očkovaných, v 6. měsíci po očkování je chráněno 100 % očkovaných. U dospělých je vývoj a nástup protektivní účinnosti proti oběma antigenům podobný, pouze titry protilátek jsou o něco nižší, avšak stále několikanásobně vyšší než po aplikaci monovakcín. Dospělým se může vakcína aplikovat ve zrychleném schématu den 0, 7 a 21. Čtvrtá dávka se aplikuje v 12. měsíci. Vakcinace zajišťuje spolehlivou ochranu proti HAV na přibližně 15 až 20 let a proti HBV na celý život. Pokud se osoba po kompletní vakcinaci proti HAV setká s aktivně nemocným člověkem (je vystavena antigennímu stimulu), pak tento kontakt působí jako přirozený booster efekt (přeočkování), který zvyšuje a prodlužuje imunitní odpověď. Nicméně, osoby které se budou chtít přeočkovat proti HAV za 20 let, ať tak učiní, ale jen monovalentní vakcínou (Havrix, Vaqta nebo Avaxim) (Beran, 2005).

Je nutné si uvědomit, že i přes velmi pozitivní roli státu v oblasti pravidelného očkování proti HBV (novorozenci, 12leté děti) je vakcinace rizikových skupin nejdůležitějším nástrojem prevence infekcí HAV a HBV. Riziko nákazy vystupuje do popředí v souvislosti s cestováním, prováděním tetováže, piercingu, s injekční aplikací

drog nebo v souvislosti s promiskuitními sexuálními aktivitami. Zde musí sehrát svoji dominantní roli prevence ve formě přesné identifikace rizika, popř. rizikové skupiny a doporučení pro vakcinaci buď monovalentními vakcínami, nebo kombinovanou očkovací látkou proti HAV a HBV (Beran, 2005).

8. TERAPIE AKUTNÍCH A CHRONICKÝCH VIROVÝCH HEPATITID

Diagnostika a léčba pacientů s virovými hepatitidami je v České republice na vysoké úrovni. Léčba u nás se nijak neliší od léčebných postupů používaných v nejvyspělejších státech světa a podobné jsou i její výsledky. Léčba je dostupná pro všechny pacienty, kteří ji potřebují a které je možné tímto způsobem léčit, a je plně hrazena zdravotními pojišťovnami. Hlavním úkolem současnosti je aktivní vyhledávání a léčba nemocných s chronickými hepatitidami B a C dříve než se u nich onemocnění dostane do pokročilých stadií, kdy je již kvalita a délka jejich života výrazně ovlivněna a léčebné možnosti omezené (Husa, 2005).

Léčba akutních virových hepatitid probíhá za hospitalizace na infekčních odděleních a klinikách, neliší se podle typů virových hepatitid. Terapeutické přístupy se nezměnily již několik desítek let a spočívají ve fyzickém a psychickém zklidnění pacienta, dietě a podávání podpůrných léků, které mají zmírňovat nepříznivé projevy onemocnění, zabránit dalšímu poškození jaterních buněk a přispět k jejich regeneraci (Husa, 2005).

8.1. LÉČBA VIROVÉ HEPATITIDY B

Léčba chronické hepatitidy B prodělala v posledních 15 letech bouřlivý vývoj. V současnosti jsou ve Spojených státech, západní Evropě a řadě dalších ekonomicky vyspělých státech světa schváleny pro léčbu chronické infekce HBV 4 preparáty – pegylovaný interferon (IFN) alfa-2a, konvenční IFN alfa, lamivudin a adefovir dipivoxil. Každý z uvedených preparátů má určité výhody a nevýhody proti ostatním a je velmi pravděpodobné, že v blízké budoucnosti bude narůstat tendence k používání „léčby šité na míru“ (tailoring therapy) každému konkrétnímu pacientovi. Interferonové preparáty mají výhodu v časově omezené době podávání a setrvalosti dosažené suprese virové replikace. Jejich nevýhodou je poměrně vysoká frekvence nežádoucích účinků léčby, nemožnost léčit pacienty s pokročilou jaterní cirhózou a některými dalšími kontraindikacemi, relativně vysoká cena a nutnost parenterálního podávání. Při hodnocení ekonomičnosti léčby chronické hepatitidy B je však nutné vzít v úvahu, že léčba interferonovými preparáty trvá maximálně 1 rok a léčba ostatními léky je zpravidla

na mnoho let, či dokonce na celý zbytek života, čímž se poměr nákladů na léčbu zcela zásadně změní (Husa, 2007).

Pegylovaný IFN alfa-2a se podává jen jednou týdně podkožně a je poněkud účinnější než konvenční IFN alfa, který je třeba aplikovat třikrát týdně podkožně. Proto se v současnosti dává pegylovanému IFN alfa-2a přednost před konvenčním IFN alfa. Doba léčby pegylovaným IFN alfa-2a je 48 týdnů. Mechanismus účinku IFN alfa je především imunomodulační, méně výrazný je přímý antivirový efekt (Šperl, 2008).

Všechny ostatní preparáty se podávají perorálně, velmi dobře se snášejí, prakticky nemají kontraindikace (lze je použít i u cirhotiků) a mají velmi výrazný přímý antivirový efekt. Jedná se o nukleosidová (lamivudin, adefovir dipivoxil) analoga. Lamivudin účinně suprimuje replikaci HBV, jednoduše se užívá a nemá závažné nežádoucí účinky. Roční léčba vede k supresi viremie a zlepšení histologického nálezu. Léčba trvající 2 roky je ještě účinnější, na druhou stranu je prodlužování léčby spojeno se strmým nárůstem podílu pacientů s mutací rezistentní k lamivudinu. Pro dlouhodobou léčbu se naopak hodí adefovir dipivoxil, u kterého je potenciál pro tvorbu a selekci rezistentních mutant HBV výrazně potlačen. Během prvního roku léčby adefovirem dipivoxilem se rezistentní mutanty HBV neobjevují a po 5 letech léčby má 29 % léčených prokazatelnou genotypovou rezistenci, ale jen 16 % má současně významný vzestup sérové HBV DNA (virologická rezistence). Adefovir je virologicky i klinicky účinný i u pacientů s na lamivudin rezistentními mutacemi HBV (Husa, 2005; Šperl, 2008).

8.2. LÉČBA VIROVÉ HEPATITIDY C

Virová hepatitida C je rozpoznána v akutním stadiu jen velmi zřídka. Léčba akutní hepatitidy C se nijak neliší od léčby jiných akutních virových hepatitid. V literatuře je řada informací o významu antivirové léčby (konvenčním nebo pegylovaným IFN alfa v monoterapii či v kombinaci s ribavirinem) pro zábranu přechodu akutní infekce HCV do chronicity, ale jednoznačně není zatím tato léčba doporučována. Zatím není jasné ani optimální dávkování a zejména doba podávání antivirových preparátů (Urbánek, 2008).

Všichni pacienti s chronickou infekcí HCV jsou potenciálními kandidáty protivirové léčby. Terapie je jednoznačně doporučena pro pacienty se zvýšeným rizikem vzniku jaterní cirhózy. Tito pacienti jsou charakterizováni prokazatelnou sérovou HCV RNA, signifikantním histologickým nálezem ve vzorku tkáně získaném biopsií jater s portální

nebo přemostující fibrózou a s alespoň střední aktivitou zánětu a středním stupněm nekróz a většina těchto pacientů má také trvale vyšší aktivitu ALT (Husa, 2007).

U ostatních pacientů nejsou rizika léčby a její případný prospěch pro pacienta natolik jednoznačná, aby u nich šlo doporučit léčbu paušálně, ale až po individuálním posouzení každého konkrétního případu. Úspěšnost léčby chronické hepatitidy C se hodnotí podle trvalého vymizení viru z krve. Během uplynulého desetiletí vzrostla účinnost léčby z původních 5 % na současných 50–60 % u nemocných infikovaných typem 1 viru a 80–85 % u pacientů nakažených typy 2 nebo 3. Tohoto výborného léčebného úspěchu je dosahováno při použití kombinace pegylovaného interferonu a ribavirinu, který je ve formě tablet nebo kapslí. Délka léčby je 48 týdnů při infekci typem viru 1, který v naší populaci jednoznačně převládá (u nás zhruba 80 % případů). Pokud je pacient infikován relativně příznivými typy viru 2 nebo 3, postačuje jen 24 týdnů léčby (Husa, 2007; Urbánek, 2008).

9. ZÁVĚR

Virové hepatitidy jsou nejčastějším jaterním onemocněním a jsou příčinou úmrtí až 2 milionů osob ročně. Dosud známých a laboratorně stanovitelných je 6 typů hepatitid a to A, B, C, D, E a G.

Diagnostika virových hepatitid je opřena o kombinaci imunologických a molekulárně genetických metod. Rutinní stanovení markerů je pak většinou založeno na principu enzymové imunoanalýzy na mikročasticích.

Dříve hojně se vyskytující hepatitida A je prokazatelná přítomností protilátek anti-HAV třídy IgM, které jsou specifické pro akutní průběh infekce. Nyní se tato hepatitida vyskytuje jen při sníženém hygienickém standardu.

Jedním z nejzávažnějších zdravotnických problémů jsou virové hepatitidy B a C. Sérologická diagnostika virové hepatitidy B je poměrně komplikovaná, protože se sleduje řada antigenů a protilátek. Akutní forma je prokazatelná přítomností antigenu HBsAg, antigenu HBeAg a přítomností protilátek anti-HBc třídy IgM. Přestup infekce do chronicity je pak možné určit pomocí protilátek anti-HBc třídy IgG a anti-HBe. Průkaz protilátek anti-HBs je specifický pro proběhlou infekci nebo pro úspěšné očkování. Nejcitlivějším ukazatelem virové replikace je stanovení HBV DNA pomocí molekulárně hybridizačních metod nebo polymerázovou řetězovou reakcí.

Virová hepatitida C je ve většině případů diagnostikována až ve stádiu chronické hepatitidy. Rutinně se používá vyšetření protilátek anti-HCV třídy IgG. Nejdůležitějším konfirmačním rutinním testem u všech pacientů, kteří mají reaktivitu v testu ELISA, je rekombinantní imunoblotová analýza (RIBA-2). Pro určení akutní formy je nutné vyšetření virové RNA metodou PCR.

U viru hepatitidy D je typickým průkazem přítomnost antigenu HBsAg společně s protilátkami anti-HDV třídy IgM. Ve specializovaných laboratořích se stanovuje antigen HDAg a HDV RNA, určující akutní fázi hepatitidy.

V České republice k méně se vyskytujícím patří hepatitidy E a G, jejichž průkaz je založen na stanovení protilátek anti-HEV třídy IgM a průkazu virové RNA u hepatitidy G pomocí PCR.

Většina virových hepatitid je v důsledku poškození jaterních buněk doprovázena zvýšenými hodnotami bilirubinu a aminotransferáz.

Počet virových hepatitid A a B se postupem let snižuje z důvodu preventivních opatření a úspěšné vakcinace . Dostupné vakcíny proti A jsou Havrix Junior, Havrix 1440, Avaxim, Vaqta Pediatric a Vaqta Adult a dostupné vakcíny proti B jsou Engerix B, HBVAX II a HBVAX PRO. Mimo to je možné využít i kombinované vakcíny Twinrix Adult a Twinrix paediatric.

Pacienti s virovými hepatitidami jsou v České republice léčeni nejmodernějšími dostupnými prostředky. Mezi nejpoužívanější preparáty patří interferon alfa-2a. Léčba u nás se nijak neliší od léčebných postupů používaných v jiných zemích.

SEZNAM ZKRATEK

ALP	alkalická fosfatáza
ALT	alaninaminotransferáza
anti-HAV celkové	celkové protilátky proti viru hepatitidy A (anamnestické)
anti-HAV IgM	protilátky proti viru hepatitidy A ve třídě IgM (časné)
anti-HBc celkové	celkové protilátky proti dřeňovému antigenu viru hepatitidy B
anti-HBc IgM	protilátky IgM proti dřeňovému antigenu viru hepatitidy B
anti-HBe	protilátky proti »e« antigenu viru hepatitidy B
anti- HBs	protilátky proti povrchovému antigenu viru hepatitidy B
anti-HCV	protilátky proti viru hepatitidy
anti-HDV celkové	celkové protilátky proti viru hepatitidy D (anamnestické)
anti-HDV IgM	protilátky proti viru hepatitidy D ve třídě IgM (časné)
anti-HEV	protilátky proti viru hepatitidy E
anti-HGV	protilátky proti obalovému proteinu viru hepatitidy G
anti-LKM	mikrosomální protilátka játra-ledvina
AST	aspartátaminotransferáza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EBV	virus Epstein-Barr
ELISA	enzymatická imunosorpční analýza
FPIA	Fluorescence polarization immunoassay
GGT	γ -glutamyltransferáza
HAV	virus hepatitidy A

HBcAg	dřeňový (core) antigen viru hepatitidy B
HBeAg	»e« antigen viru hepatitidy B
HBsAg	povrchový (surface) antigen viru hepatitidy B
HBV DNA	deoxyribonukleová kyselina viru hepatitidy B
HBV	virus hepatitidy B
HCV RNA	ribonukleová kyselina viru hepatitidy C
HCV	virus hepatitidy C
HDAg	antigen viru hepatitidy D
HDV	virus hepatitidy D
HEV	virus hepatitidy E
HGVB-C	virus hepatitidy GB-C (totožný s HGV)
HGV RNA	ribonukleová kyselina viru hepatitidy G
HIV	virus lidské imunodeficiency
IFN	interferon
MEIA	Microparticle Enzyme Immunoassay
mRNA	informační ribonukleová kyselina
MU	methylumbelliferon
MUP	4-methylumbelliferylfosfát
NRL	národní referenční laboratoř
ORF	otevřený čtecí rámeček
PCR	polymerázová řetězová reakce
rHBcAg	rekombinantní core antigen viru hepatitidy B
RIBA	rekombinantní imunoblot

RNA	ribonukleová kyselina
SOD	superoxiddismutáza
TMA	transcription-mediated amplification
TTV	TT virus
VH	virová hepatitida

PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

1. Anonym: Uživatelská příručka systému ABBOTT AxSYM®, 36-5130/R1, 2004
2. Beran J.: Současné možnosti očkování proti virové hepatitidě A a B; *Remedia* 2005; 15(1), 84–89.
3. Ehrmann J., Hauftová D., Husa P., Krč I., Procházka V., Schneiderka P.: *Ikterus-diferenciální diagnostika*, Grada Publishing a.s., 2003, 274
4. Horák J., Stříteský J.: *Chronické hepatitidy*, Grada Publishing a.s., 1999, 173
5. Husa P.: Novinky v léčbě chronických virových hepatitid; *Medicína pro praxi* 2007; 4(7), 291-294.
6. Husa P.: *Virové hepatitidy*, Galén, 2005, 241
7. Husa P.: *Virové hepatitidy - etiologie, diagnostika, léčba a prevence*; *Practicus s r.o.* 2005, 4(8), 322-325.
8. Lata J., Vaňásek T.: *Kritické stavy v hepatologii*, Grada Publishing a.s., 2005, 299
9. Mareček Z.: *Laboratorní diagnostika v hepatologii*; „*Laboratorní diagnostika*“ (Ed. Zima T.), Galén, 2002, 81-96
10. Mareček Z., Vitek L.: *Laboratorní diagnostika v hepatologii*; „*Laboratorní diagnostika, druhé doplněné vydání*“ (Ed. Zima T.), Karolinum, 2007, 97-117
11. Masopust J.: *Játra a žlučové cesty (Klinická biochemie-poradování a hodnocení biochemických vyšetření*; Ed. J. Masopust), Karolinum Praha, 1998, 139-204
12. Rožnovský L.: *Virové hepatitidy – stále aktuální téma*; *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství* 2007; 13(2), 47.

13. Sherlocková S., Dooley J.: Nemoci jater a žlučových cest, Auris,s.r.o., 2002, 703
14. Stránský J.: Virová hepatitida C, Grada Publishing a.s., 1999, 194
15. Stránský J.: Virová hepatitida B a její klinický význam, Grada Publishing a.s., 2001, 202
16. Šperl J.: Léčba chronické hepatitidy B; „Novinky v gastroenterologii a hepatologii“ (Ed. Špičák J., Bureš J., Leffler J., Lukáš M., Martínek J. a kol.), Grada Publishing, a.s., 2008, 271-290
17. Urbánek P.: Infekce virem hepatitidy C; „Novinky v gastroenterologii a hepatologii“ (Ed. Špičák J., Bureš J., Leffler J., Lukáš M., Martínek J. a kol.), Grada Publishing, a.s., 2008, 295-319
18. Internet 1.: www.medicinapropraxi.cz - 20.02.2009
19. Internet 2.: www.roche.cz – 20.04.2009