



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

**Vyšetřování HIV pozitivních pacientů na Oddělení klinické  
biochemie a imunologie v Nemocnici Na Bulovce**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program:

**SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ**

**Autor:** Gabriela Chudáčková

**Vedoucí práce:** Mgr. Tomáš Kotraš

České Budějovice 2017

# **Vyšetřování HIV pozitivních pacientů na Oddělení klinické biochemie a imunologie v Nemocnici Na Bulovce**

## **Abstrakt**

HIV je virus lidské imunodeficiencie, který napadá buňky imunitního systému hostitele a snižuje tak schopnost imunitního systému adekvátně reagovat na přítomnost jiných infekčních agens, se kterými by si zdravý imunitní systém obvykle poradil. Antiretrovirová léčba HIV nevede k úplnému odbourání viru z organismu, pouze jen dokáže blokovat jeho dalšího množení v hostitelských buňkách. Antiretrovirotika jsou založena především na inhibici enzymů viru. Kombinovaná léčba nebo také HAART (z angl. Highly Active Antiretroviral Therapy) spočívá v kombinaci tří a více léků s rozdílnými účinky. Každý z těchto léků reaguje s jinými receptory, enzymy, atd. a na odlišné fáze životního cyklu viru. Účinky léčby a její negativní dopady na organismus pacientů jsou monitorovány v pravidelných intervalech v AIDS centru Nemocnice Na Bulovce. Odtud je odebraný biologický materiál zasílán na různá oddělení dle požadavků na vyšetření.

Cílem této bakalářské práce je seznámení se s vybranými biochemickými a imunologickými parametry vyšetřovanými na Oddělení klinické biochemie a imunologie v Nemocnici Na Bulovce a pomocí těchto parametrů se pokusit zjistit účinky léčby u vybraných pacientů, u nichž byla již HIV pozitivita prokázána, detekcí povrchových znaků CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> na Th-lymfocytech pomocí průtokové cytometrie. Monitorování stavu pacientů během jejich terapie pomocí vybraných biochemických markerů analyzovaných na automatickém biochemickém analyzátoru. Dále pak zhodnocení a popis současných možností laboratorního stanovení při detekci HIV infekce.

## **Abstract**

HIV is a human immunodeficiency virus that attacks the host's immune system and reduces the ability of the immune system to respond adequately to the presence of other infectious agents with which the healthy immune system would usually advise. HIV antiretroviral therapy doesn't ensure complete removal of the virus from the organism. The therapy only blocks further proliferation of viral cells in host cells. Antiretrovirotics are primarily based on the inhibition of viral enzymes. Combined treatment or HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) consists of a combination of three or more medicines with different effects. Each of these medicines reacts with other receptors and with other enzymes and reacts at different stages of the life cycle of the virus. The effects of treatment and its negative effects on the patient's organism are monitored at regular intervals in the AIDS center in the hospital Na Bulovce. Employees from this center send patient samples to different departments according to examination requirements.

The aim of this bachelor thesis is to acquaint with selected biochemical and immunological parameters investigated at the Department of Clinical Biochemistry and Immunology in the hospital Na Bulovce and use these parameters to try to find out effects of treatment in selected patients who have already been detected HIV positive by detection of surface features CD4 + and CD8 + On Th-lymphocytes by flow cytometry. Furthermore monitoring patient's status during therapy with selected biochemical markers analyzed on an automated biochemical analyzer and also evaluation and description of the current possibilities of laboratory determination in the detection of HIV infection.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 10. 8. 2017

Gabriela Chudáčková

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala mému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Tomášovi Kotrašovi za odborné vedení mé bakalářské práce, za cenné rady, vstřícnost při konzultacích a vypracování této práce. Dále bych ráda poděkovala mé vrchní laborantce Marii Vémolové za poskytnutí prostoru a času při tvorbě této práce a Bc. Bartošovi za pomoc s formátováním této bakalářské práce.

## Obsah

<b>TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>10</b>
<b>1. HIV PŮVODCE VIRU LIDSKÉ IMUNODEFICIENCE.....</b>	<b>10</b>
1.1 PŮVOD HIV .....	10
1.2 OBJEVENÍ HIV .....	11
1.3 NOBELOVA CENA ZA MEDICÍNU A FYZIOLOGII.....	12
<b>2. HIV V ČESKÉ REPUBLICCE.....</b>	<b>13</b>
<b>3. ZPŮSOBY PŘENOSU .....</b>	<b>13</b>
3.1 VLASTNOSTI VIRU .....	14
3.1.1 <i>Struktura viru.....</i>	<i>16</i>
3.1.2 <i>Průnik viru do buňky .....</i>	<i>17</i>
3.1.2.1 <i>Transkripce.....</i>	<i>18</i>
3.1.2.2 <i>Retroviry a reverzní transkripce.....</i>	<i>19</i>
<b>4. KLASIFIKACE HIV INFEKCE PODLE CDC.....</b>	<b>19</b>
<b>5. ANTIRETROVIROVÁ LÉČBA HIV .....</b>	<b>20</b>
5.1 TYPY ANTIRETROVIROVÉ LÉČBY .....	21
<b>6. STRUČNÁ FYZIOLOGIE IMUNITNÍHO SYSTÉMU.....</b>	<b>23</b>
6.1 PRIMÁRNÍ LYMFATICKÉ ORGÁNY .....	23
6.2 SEKUNDÁRNÍ LYMFATICKÉ ORGÁNY .....	23
6.3 BUNĚČNÉ SLOŽKY IMUNITY .....	24
6.4 HUMORÁLNÍ SLOŽKY IMUNITY .....	25
<b>7. LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA PRO VYŠETŘENÍ BUNĚČNÉ IMUNITY</b>	<b>26</b>
7.1 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE.....	27
<b>8. STANOVENÍ HIV.....</b>	<b>28</b>
8.1 ARCHITECT i2000 IMUNOCHEMICKÝ MODUL.....	28
8.1.1 <i>Nezbytné sloučeniny pro zpracování metody CMLA.....</i>	<i>28</i>
8.1.2 <i>HIV Ag/Ab Combo.....</i>	<i>28</i>
8.1.3 <i>Vyhodnocení testů.....</i>	<i>29</i>
<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>32</b>
<b>9. LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA BIOCHEMICKÝCH MARKERŮ Z</b>	<b>32</b>
<b>KRVE HIV POZITIVNÍCH PACIENTŮ .....</b>	<b>32</b>
9.1 LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ .....	32
9.1.1 <i>Plně automatický analyzátor Architect .....</i>	<i>33</i>
9.1.1.1 <i>Biochemický modul .....</i>	<i>33</i>

9.1.1.2	Imunochemický modul.....	33
9.2	POŽADAVKY NA ODBĚR JEDNOTLIVÝCH BIOCHEMICKÝCH MARKERŮ A VYŠETŘENÍ HIV .....	34
<b>10.</b>	<b>BIOCHEMICKÝ ANALYZÁTOR ARCHITECT CI8200 .....</b>	<b>35</b>
10.	FOTOMETRICKÁ METODA .....	35
10.1	OPTICKÉ MĚŘENÍ.....	35
10.2	BIOCHEMICKÉ MARKERY.....	36
10.2.1	<i>Laktát</i> .....	36
10.2.2	<i>Lipidy</i> .....	37
10.2.3	<i>Cholesterol</i> .....	38
10.2.4	<i>HDL cholesterol</i> .....	39
10.2.5	<i>Triacylglyceroly</i> .....	40
<b>11.</b>	<b>IMUNOFENOTIPIZACE JEDNOTLIVÝCH SUBPOPULACÍ T- LYMFOCYTŮ Z KRVE HIV POZITIVNÍCH PACIENTŮ NA PŘÍSTROJI BD FACSCANTO II .....</b>	<b>41</b>
11.	POUŽÍVANÉ LASERY A DETEKCE FLUORESCENCE DLE POUŽÍVANÉHO TYPU LASERU .....	41
11.1	POŽADOVANÉ REAGENCIE .....	41
11.2	KALIBRACE A KONTROLA KVALITY .....	42
11.3	VLASTNÍ ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ .....	42
<b>12.</b>	<b>DISKUZE: .....</b>	<b>55</b>
<b>13.</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>58</b>
<b>14.</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>62</b>
<b>15.</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>70</b>

# Úvod

Tématem bakalářské práce je vyšetřování HIV pozitivních pacientů na Oddělení klinické biochemie a imunologie v Nemocnici Na Bulovce. HIV/AIDS jsou stále celosvětovým problémem, který se týká každého z nás. Nevědomost a rychlé šíření nákazy daly za vznik pandemii, na kterou je dnešní medicína dosud krátká. Nepřetržitá snaha najít účinnou léčbu poskytla alespoň naději v prodloužení latence onemocnění a zlepšení v kvalitě života nakažených tímto zákeřným vírem díky antiretrovirové léčbě. Léčba spočívá v blokaci buněčných receptorů, inhibici enzymů pro přepis virové RNA nebo také v inhibici enzymů pro štěpení virových polypeptidů. Je sice zamezeno množení a šíření viru v hostitelských buňkách, ale léčba sebou nese i negativní stránky. Mutace viru, rezistence a nežádoucí účinky antiretrovirotik jsou dalšími nepřáteli v tomto boji. Úspěchy v léčbě naopak snižují obezřetnost v chování lidí, vymizel strach z onemocnění, který byl v předchozích letech všudypřítomný, což urychluje šíření infekce. Mezi nežádoucí účinky, které tyto léky vyvolávají, patří např. laktátová acidóza, hypertriacylglycerémie, hypercholesterolemie, pankreatitida nebo také nervové poruchy. Jak již bylo zmíněno, jedná se o virus patřící do čeledi retrovirů, které se množí pomocí svého genetického kódu, který se přepisuje do hostitelské DNA. Do hostitelské DNA se dostane navázáním na povrchové membránové glykoproteinové molekuly napadené buňky pomocí enzymů. K navázání vyžaduje specifické receptory, které jsou zejména na povrchu Th-lymfocytů. Tyto lymfocyty jsou důležité pro správnou činnost imunitního systému. V důsledku snižování CD4 lymfocytů nefunguje imunitní systém jak má a pacient umírá na „banální“ onemocnění.

Bakalářská práce je rozdělena na teoretickou a praktickou část. V teoretické části se seznámíme s historií, objevem a dalšími informacemi o tomto viru. Praktická část je zaměřena na již na vybrané metody vyšetřované v rámci pravidelných prohlídek pro sledování stavu léčby, její účinky na organismus a vývoj infekce. Zvolené biochemické markery z tohoto vyšetřovaného panelu byly vybrány s ohledem na nežádoucí účinky léčby. U buněčné populace leukocytů je potřeba sledovat poměr



CD4/CD8 jako marker stavu imunitního systému a pomáhá ke stanovení prognózy onemocnění.

# Teoretická část

## 1. HIV původce viru lidské imunodeficiency

HIV (z *angl.* Human Immunodeficiency Virus) virus lidské imunodeficiency se řadí do čeledi *Retroviridae* rodu *Lentivirus* (*lente-*, *lat.* „pomalý“). Napadá lidské buňky a způsobuje pozvolnou ztrátu funkce imunitního systému. Pro rod *Lentivirus* je charakteristické dlouhé období latence, chronický průběh onemocnění a postižení CNS. HIV je sexuálně přenosnou nemocí. Může přímo napadat i Langerhansovy buňky, které se nachází ve slizničním epitelu a v epidermis, buňky glie a jiné. Existují dva typy viru HIV; HIV-1 a HIV-2, které se liší složením povrchových struktur. HIV-1 je rozšířen celosvětově, HIV-2 je typický pro západní pobřeží afrického kontinentu (Hájek; Novák, 2004; Hobstová, 2012)

HIV je RNA virus s fosfolipidovou membránou obsahující celou řadu glykoproteinů, obsahuje také enzym reverzní transkriptázu, která umožňuje přepis genetické informace viru z RNA do DNA hostitele (Jilich et al., 2014). Napadá hlavně CD4+ Th-lymfocyty což vede k poruše imunitního systému a může vést až k tzv. syndromu získané imunitní nedostatečnosti AIDS (z *angl.* Acquired Immune Deficiency Syndrome). AIDS je posledním stádiem infekce HIV, které se projevuje oportunními infekcemi anebo také rakovinou související s infekcemi. Virus HIV je velmi dobře přizpůsobivý prostředí a mutagenní. Tyto vlastnosti patří mezi hlavní příčiny neúspěchu při vývoji účinné vakcíny.

### 1.1 Původ HIV

Původ HIV není doposud jasný. Vychází se ze dvou skutečností - kolébka v Africe a příbuznost viru lidské imunodeficiency s opičím virem (SIV).(Rozsypal, 1998). K přenosu viru SIV na člověka nejpravděpodobněji došlo při lovu opic a jejich porcování. Vědci se snaží odhadnout, kdy došlo k mutaci viru a přenosu na člověka, zatím se domnívají, že k přenosu mohlo dojít mezi lety 1901-1921 nezávisle několikrát za sebou (Jilich et al., 2014). Jednou z možných teorií je, že pandemie začala v roce

1920 v hlavním městě Kinshasa (Kongo). Vědci dospěli k tomuto závěru při zkoumání genetického původu viru. Jeho šíření bylo podpořeno výstavbou nových železnic mezi dalšími městy na africkém kontinentu (Science, 2014). Také domorodé rituály, putování obyvatel za prací a prostituce rychle šířily virus od domorodých kmenů do větších měst. Migrace a turismus pak rozšířily virus do USA a do Evropy. Testováním archivních vzorků u zemědělců na AIDS došlo k identifikování dosud nejstarší oběti. Byl jím lovec z Kamerunu, který v roce 1959 zemřel v nemocnici ve městě Kinshasa (Konvalinka; Machala, 2011; Jilich et al., 2014).

### ***1.2 Objevení HIV***

V roce 1981 americký lékař M. S. Gottlieb popsal 5 případů pneumocystové pneumonie u mladých homosexuálních mužů, u kterých byl zároveň detekován pokles T<sub>H</sub> lymfocytů. Na jaře roku 1981 diagnostikoval dermatolog MUDr. Friedman-Kien vzácný Kaposiho sarkom u dvou homosexuálních mužů. Každý z těchto pacientů měl z neznámého důvodu hluboký rozvrat imunitního systému (Hájek et al., 2004). V centru pro kontrolu a prevenci nemocí (CDC), byl vytvořen tým, který pátral po dalších případech náhlého úmrtí mladých homosexuálních mužů. U každého podobně nemocného byla zjištěna těžká imunodeficiencie CD4+ T-lymfocytů (Jilich et al., 2014). Neznámá porucha imunity byla ze začátku nazvána jako GRID (Gay-Related Immune Deficiency). (Hájek et al., 2004). Ta se později objevila i u žen pocházejících z Haiti a u uživatelů injekčních drog. V roce 1983 byl zjištěn přenos viru krevní transfúzí. Díky uchovaným vzorkům sér hemofiliků, bylo testováním zjištěno, že k prvnímu přenosu krevní transfúzí došlo již v roce 1978. V prosinci roku 1982 bylo již zjištěno 711 případů v 16 různých zemích. Existence příznaků tohoto onemocnění byla zjištěna i v některých částech Afriky. Zdravotnické úřady přijaly pro onemocnění označení acquired immune deficiency syndrome (syndrom získaného selhání imunity), zkráceně AIDS (Jilich et al., 2014). V letech 1983-1984 dva výzkumné týmy nezávisle na sobě objevily původce onemocnění. První tým byl veden Luckem Montagnierem v Pasteurově ústavu v Paříži a druhý vedl Robert Gallo v Národním onkologickém institutu v Bethesdě (Konvalinka; Machala, 2011). V roce 1986 došlo ke sjednocení názvu HIV (Human Immunodeficiency Virus). V tomtéž roce byl objeven příbuzný

virus označen HIV-2. Během poloviny 80. let se virus HIV rozšířil z USA do zemí západní Evropy a ostatních zemí světa (M. Hájek et al., 2004).

### ***1.3 Nobelova cena za medicínu a fyziologii***

V Roce 2008 byla udělena Nobelova cena za medicínu třem významným virologům. Mezi těmito oceněnými byli i profesor Luc Montagnier a doktorka Francoise Barré-Sinoussi z Pasteurova ústavu v Paříži za objevení viru HIV a tím byl vyřešen letitý spor o prioritu objevu původce onemocnění AIDS. O prvenství se přely dva instituty, americký institut National Institutes of Health, Bethesda vedený Robertem Gallo, který izoloval dva typy lidských leukemických virů HTLV-I a HTLV-II. V roce 1983 izoloval Robert Gallo spolu s československým stipendistou Mikulášem Popovičem z ČSAV v Praze nový virus postihující imunitní systém a označili ho jako HTLV-III. V tomtéž roce byl izolován v Institutu Pasteura v Paříži pod vedením Luca Montagniera spolu s doktorkou F. Barré-Sinoussi neznámý vir. Virus byl objeven u pacienta s diagnostikovanou lymfadenopatií a tak byl nazván jako Lymphadenopathy virus (LAV). Francouzský institut úzce spolupracoval z americkým institutem, ale nedisponoval tak moderní a technickou vybaveností jako americká laboratoř, proto izolát LAV poslali francouzští objevitelé právě do USA k přesnější identifikaci. A od této doby byl původ objevu spekulativní. Uplatňováním nároků na prioritu objevu ze strany francouzských virologů vedl k napadávání a obviňování z údajného podvodu při studiu virového izolátu. Díky této skutečnosti dokonce Francie odmítla laboratorní test pro diagnostiku infekce HIV krevních derivátů a dárců krve, kterou v roce 1985 vyvinuly v USA. Ve Francii se podařilo vyvinout diagnostický test až po půl roce. Půlroční zpoždění a používání netestovaných zásob krve se pro Francii stalo skandálním a ekonomicky nepříznivým. Během této půlroční prodlevy došlo ke zbytečné nákaze HIV několika tisíců obětí a ztrátám na životech. Byl odvolán ministr zdravotnictví, několik pracovníků transfúzní služby a podáno mnoho soudních žalob. V roce 1988 Virologická nomenklatorická komise ujednotila označení viru názvem Human Immunodeficiency Virus. Ujednacením názvu se však spor o prioritu objevu neuklidnil. Pomocí nově uvedené molekulárně-biologické metody se podařilo prokázat, že původ studovaného a použitého viru pro přípravu prvních amerických diagnostických testů byl

z francouzského izolátu nazvaného LAV. A tak se v roce 1994 zcela uzavřela kapitola priority objevu. Objev byl tedy připsán francouzským vědcům (SZÚ, 2009).

## **2. HIV v České republice**

První zmínka o viru HIV v ČSSR se objevila v letech 1981 – 1982 v novinách. Zprvu byla nákaza prezentována jako onemocnění homosexuálů a narkomanů ze zemí západního kapitalistického světa, kteří podle socialistické vlády v zemi nežijí. Přesto byla vyčleněna skupina odborníků, jež měla za úkol odhalit eventuální případy onemocnění v ČSSR. Tato skupina vznikla v roce 1983 ve Fakultní nemocnici na Bulovce. První případy byly diagnostikovány v roce 1984 u dvou homosexuálních mužů. A následovaly další případy. Testování na protilátky HIV se v té době provádělo ve virologickém ústavu ve Vídni. V roce 1985, 5. prosince, vzniká při Státním zdravotním ústavu v Praze (SZÚ) Národní referenční laboratoř pro HIV, kterou vedl Doc. MUDr. Lubomír Syrůček, CSc. V tomtéž roce bylo založeno první AIDS centrum v Československu. Místem vzniku bylo infekční oddělení ve Fakultní nemocnici Na Bulovce v Praze pod vedením Doc. MUDr. Marie Staňkové, CSc. V roce 1986 se začala testovat přítomnost protilátek v krvi pacientů proti HIV, kromě homosexuálů a narkomanů se začali testovat i dárce krve a při pozitivním zjištění u dárců i příjemci krevních transfuzí. Od roku 1987 se v České republice zavedlo povinné testování na HIV u každého dárce krve. První lék byl přivezen v roce 1988. Bohužel lék stačil pouze pro tři pacienty, a tak byli vybrání nemocní v pokročilém stádiu AIDS. Od roku 1989 začalo HIV pozitivních přibývat, a proto byla potřeba otevřít nová AIDS centra po celé republice (Jilich et al., 2014).

## **3. Způsoby přenosu**

Virus se vyskytuje v tělních tekutinách, nejvíce v krvi, poševním sekretu a spermatu, v mateřském mléce, cerebrospinální tekutině a dalších. V nepatrném množství se vyskytuje v potu, ve slinách, v moči. Hlavními způsoby přenosu jsou zejména pohlavní styk, krevní transfuze. V rozvinutých státech je přenos krevních transfuzí vzácný, díky testování dárců krve. K přenosu dochází u uživatelů drog při

užívání infikovaných jehel a k přenosu z pozitivní matky na plod. Nechráněný anální styk představuje nejvyšší riziko přenosu (0,1 – 7,5 %). (Konvalinka; Machala, 2011; Hobstová et al., 2012).

Vědecké studie vyloučily přenosy: běžným kontaktem s nakaženým  
kapénkami při kašláni či kýchání  
přímým potřísněním krví HIV pozitivní osoby,  
v případě neporušené kůže  
bodavým hmyzem

Dosud byly prokázány 3 hlavní způsoby přenosu: krevní cestou  
pohlavním stykem  
z matky na dítě  
(Hájek et al., 2012)

### ***3.1 Vlastnosti viru***

Viry obecně jsou neaktivní nebuněčné organismy, které ke svému množení potřebují hostitelskou buňku. Jsou tvořeny nukleovou kyselinou obalenou proteinovým obalem (kapsida), některé viry mají i membránový obal, bičíky a enzymy potřebné k množení. K navázání na specifické receptory hostitelských buněk jsou důležité povrchové glykoproteiny. Genetická informace je zakódována ve formě DNA nebo RNA. Podle typu genetické informace se tedy dělí na DNA viry a RNA viry. DNA viry mají svou nukleovou kyselinu buď ve formě lineární, nebo cyklické a může být buď jednovláknová či douvláknová. K transkripci a translaci dochází přímo. RNA viry nacházíme v podobě jednovláknové nebo dvouvláknové. U jednovláknové RNA dochází k proteosyntéze přímo, z dvouvláknové RNA musí nejprve pomocí replikace vzniknout komplementární vlákno RNA.

Tabulka 1: Dělení čeledi virů podle genoforu

Příklad dělení čeledi virů podle genoforu			
RNA			
+ssRNA	-ssRNA	dsRNA	+ssRNA s RT
<i>Picornaviridae</i>	<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Reoviridae</i>	<i>Retroviridae</i>
<i>Togaviridae</i>	<i>Filoviridae</i>		
<i>Coronaviridae</i>	<i>Rhabdoviridae</i>		
	<i>Orthomyxoviridae</i>		
	<i>Bunyaviridae</i>		

DNA		
ssDNA	dsDNA	dsDNA s RT
<i>Geminiviridae</i>	<i>Adenoviridae</i>	<i>Hepadnaviridae</i>
<i>Parvoviridae</i>	<i>Papovaviridae</i>	<i>Caulimoviridae</i>
<i>Circoviridae</i>	<i>Myoviridae</i>	
	<i>Siphoviridae</i>	
	<i>Herpesviridae</i>	
	<i>Poxviridae</i>	

Virus lidské imunodeficiency (HIV) patří do čeledi *Retroviridae*. Patří do rodu *Lentivirus*. Genetická informace viru je zapsána v molekule RNA. Existují dva typy HIV-1, který je původcem většiny onemocnění a HIV-2. U HIV-1 rozeznáváme tři základní kmene viru O (outlier), M (major) a N (non-M; non-O). Kmen M způsobuje globální pandemii, N a O jsou relativně vzácné, endemie ve středozápadní Africe (i přesto byly identifikovány v Evropě a USA). Tyto viry jsou schopné svou RNA přepisovat do provirové DNA díky enzymu reverzní transkriptáze. Pro lentiviry je klasická dlouhodobá latence, replikace viru a chronický průběh onemocnění. Zásah regulačních proteinů v průběhu replikace viru je charakteristickým znakem odlišujícím životní cyklus lentiviru od ostatních členů retrovirů (Rozsypal, 1998; Staňková et al., 2002; Konvalinka; Machala, 2011; Jilich et al., 2014).

### 3.1.1 Struktura viru

Virová částice kulovitého tvaru o průměru asi 100 nm je na povrchu tvořena fosfolipidovou membránou, do níž jsou zakotveny glykoproteiny. Celkem 72 glykoproteinových komplexů na povrchu membrány je složeno z vnějšího trimetrického glykoproteinu gp120, který zodpovídá za adsorpci virionu na buněčné receptory a glykoproteinu gp41 zodpovědného za fúzi virového obalu s lipoproteinovou membránou hostitelské buňky, uloženého transmembránově. Glykoproteiny gp41 a gp120 jsou produkty štěpení glykoproteinu gp160. Dále je v obalu zakotvena proteinová matrix p17, která kryje kapsidu obsahující protein p24. Genom je tvořen dvěma identickými vlákny RNA. Obdobně jako u jiných retrovirů, tak i v HIV genomu bylo prokázáno 9 genů, tři strukturní, které kódují strukturní proteiny, a 6 nestrukturních genů s regulační funkcí. (Rozsypal, 1998; Jilich et al., 2014).

#### Geny strukturní:

- gen kódující dřevový protein p55 se nazývá *gag*, štěpením proteinu p55 vzniká matrix, p24 a p15, která se dále štěpí na proteiny p7 a p9. Tyto bazické polypeptidy se váží na nukleové kyseliny hostitelské buňky.
- enzym proteináza p11, reverzní transkriptáza p51, integráza p34 a ribonukleáza p15 jsou kódovány genem *pol*.
- glykoprotein gp160 je kódován genem *env*.

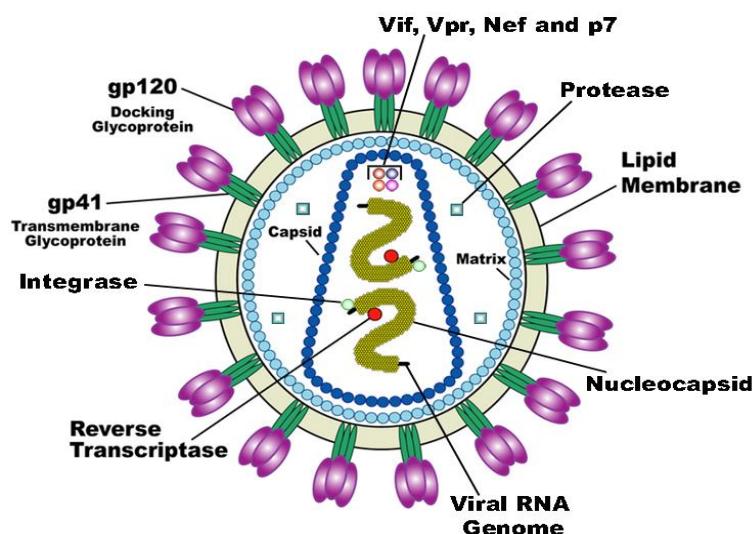
#### Geny nestrukturní:

- geny *tat*, *rev* a *nef* regulují expresi virových genů
- geny *vif* a *vpu* se podílí na morfogenezi a vyzrání HIV
- u genu *vpr* je funkce neznámá

Vlastností HIV je vysoká schopnost přizpůsobení na základě přítomných genů *gag* a *env* a jejich struktury rozlišujeme několik subtypů (Rozsypal, 1998).



Obrázek 1: Struktura viru HIV



Zdroj: <http://viry-bakterie.wz.cz/1>

### 3.1.2 Průnik viru do buňky

Virus rozeznává receptory na hostitelských buňkách. Těmito receptory jsou specifické molekuly na povrchu buněk a označují se CD4, CCR5 a CXCR4. K CCR5 mají blízko hlavně M-tropní kmeny (infikují makrofágy a dendrické buňky) HIV-1 a na CXCR4 na povrchu CD4 lymfocytů se pojí T-tropní kmeny (infikují T-lymfocyty) HIV-1. Aby se mohl vir navázat, vyžaduje vždy přítomnost membránového receptoru CD4, který se vyskytuje na povrchu Th-lymfocytů, monocytů, makrofágů a dendrických buněk. Přítomnost dalších receptorů závisí na typu atakované buňky a jejich použití na kmeni HIV viru (Hájek, 2004; Konvalinka; Machala, 2011). Na znak CD4 se naváže virový glykoprotein gp120 s vysokou afinitou, díky této vazbě je umožněn průnik viru do buňky endocytózou a splnutím virového obalu s povrchem buňky zprostředkované glykoproteinem gp41 a následným průnikem nukleové kyseliny do buněčné cytoplazmy.

Znak CXCR4 zvaný též fusin je chemkinový receptor pro CXC chemokin SDF-1 a CCR5 je pro  $\beta$ -chemokiny RANTES, MIP-1 $\alpha$ ; MIP-1 $\beta$ . Fusin umožňuje vstup

syncytia indukujícího (SI) viru do T-lymfocytů, CCR5 dovoluje vzniknutí non-SI fenotypu do makrofágů. Rozdílné vnímání lidí k HIV infekci je dáno těmito korereceptory. Lidé s nadměrně vysokými hladinami  $\beta$ -chemokinů, patří mezi mimořádně odolné vůči HIV infekci.

Během dezintegrace kapsidy se do hostitelské buňky uvolňuje virová RNA. Genom virové RNA je přepsán reverzní transkriptázou. Reverzní transkriptáza je specifický virový enzym, který přepisuje virovou RNA do dvouřetězcové lineární DNA. dsDNA se stočí do kruhové formy a virovou integrázou je zapojena do DNA hostitelské buňky jako provirus. Aktivace T-lymfocytů zapříčiní další přepis informace, syntézu virových proteinů a následné uvolnění virionu z buňky (Rozsypal, 1998).

### 3.1.2.1 *Transkripce*

Transkripce probíhá ve všech živých organismech včetně virů. Jedná se o přenos genetické informace z DNA do molekuly RNA a při reverzní transkripci naopak. U eukaryotických buněk probíhá transkripce v jádře za vzniku pre-mRNA  $\rightarrow$  mRNA, která opouští jádro a následně se uplatňuje v translaci. Na jejím 5'-konci je speciální nukleotid, který tvoří tzv. čepičku (cap). Transkripce je katalyzována DNA-dependentní-RNA-polymerázou (též RNA-polymeráza). RNA-polymeráza existuje nejméně ve třech různých typech. RNA-polymeráza I syntetizující RNA se sedimentačním koeficientem 45S. Produktem RNA-polymerázy II jsou hnRNA z nich vznikají následně mRNA a prekurzory pro snRNA (small nuclear RNA) a RNA-polymeráza III transkribuje geny pro tRNA. K zahájení transkripce je potřeba, aby se RNA-polymeráza II spolu s dalšími proteiny spojila do základního transkripčního komplexu. Tento komplex vzniká spojením transkripčních faktorů v daném pořadí s DNA a s polymerázou na 3'-konci promotorové oblasti. V této oblasti nacházejí signální sekvence (tzv. TATA box; CCAAT box). Na základě komplementarity bází ve směru 5'  $\rightarrow$  3' dochází k vytvoření vlákna RNA. mRNA obsahuje exony, jedná se o úseky genů, které kódují pořadí AMK a mezi tyto úseky jsou včleněny úseky zvané introny. Introny jsou nekódující geny a nesou informaci o pořadí AMK na polypeptidu, proto jsou v průběhu posttranskripční úpravy

vystřihávány. tRNA a rRNA jsou upravovány podobně jako mRNA. ( Koolman, Röhms 2012; Otová, Mihalová, 2012)

### 3.1.2.2 *Retroviry a reverzní transkripce*

U retrovirů se prokázalo, že transkripce funguje opačně. Tedy, že podle virové RNA se tvoří komplementární vlákno DNA, tento proces se nazývá reverzní transkripce. Reakce je katalyzována RNA-dependentní DNA-polymerázou. Do této skupiny patří enzym reverzní transkriptáza. Vzniklá komplementární DNA se začleňuje do hostitelské buňky jako provirus, podle kterého se tvoří vlákna RNA. Infikovaná buňka přežívá dlouho a stává se trvalým zdrojem infekce (Kočárek, 2007).

## 4. **Klasifikace HIV infekce podle CDC**

Od roku 1993 jsou pacienti dle klasifikace CDC rozděleni do tří klinických kategorií A, B, C a podle hladiny CD4 lymfocytů se dělí na kategorie 1, 2, 3.

Primární HIV infekce se vyznačuje přítomností antigenu p24 v krvi, vysokou hladinou RNA HIV a přechodným poklesem CD4 lymfocytů. Toto stádium nastává 3 - 6 týdnů po infikování virem, u nakaženého se objeví necharakteristické příznaky, jako jsou např. chřipkové obtíže, zduřené lymfatické uzliny a exantémy. Po určité době následuje sérokonverze anti-HIV protilátek. Klinické příznaky přechodně vymizí a laboratorní nálezy se upraví. Následuje asymptomatické období (A), které může trvat až několik desítek let, během kterých dochází k postupnému snižování hladiny CD4 lymfocytů a zvyšuje se virová nálož HIV v krvi. Jakmile dojde k poklesu CD4 lymfocytů pod 500/μl pacient přechází do časného symptomatického stádia (B). V tomto stádiu dochází k výskytu některých oportunních infekcí jako jsou dermatitidy, kandidové infekce, herpes zoster, vlasatá leukoplakie jazyka a periferní neuropatii či trombocytopenii. Hladina CD4 lymfocytů je v rozmezí mezi 500-200/μl, virová nálož stoupá. Po několika letech následuje pozdní symptomatické stádium (C), u kterého dochází k poklesu CD4 lymfocytů pod 200/μl a objevují se četné oportunní infekce (pneumocystová pneumonie, kandidová ezofagitida) a malignity jako jsou Kaposiho sarkom, lymfomy a karcinom děložního čípku, kachexie a encefalopatie, lymfopenie.

Výskyt těchto onemocnění definují syndrom získané imunodeficiency AIDS (M. Staňková; 2002). Jedná se o konečné stádium infekce HIV charakteristické úplným vyčerpáním imunitního systému a neschopností odolávat parazitárním, virovým, plísňovým, bakteriálním a nádorovým onemocněním. U HIV pozitivních pacientů doposud není známo, zda všichni nakažení přejdou do stádia AIDS. Bez léčby dojde k rozvoji onemocnění AIDS asi u 70% nakažených HIV do deseti let. V rozvinutém stádiu HIV infekce (C) dochází k poklesu CD4 lymfocytů pod 50/μl doprovázené hlubokými imunodeficity, jako cytomegalovirová retinitida, atypické mykobakteriízy. Hladina virové nálože dosahuje bez terapie miliónových hodnot (Staňková, 2002).

## **5. Antiretrovirová léčba HIV**

Dlouhodobé výzkumy a snaha vyvinout léčbu vedla k úspěchu a vývoji četných antiretrovirových léků k léčbě HIV/AIDS. V dnešní době je již vyvinuto a schváleno 31 antiretrovirových léků, které ale pacienta z HIV a AIDS nevléčí, pro mnohé pacienty se tak onemocnění stává chronickým. Léčba HIV je prováděna výhradně farmakologicky pomocí antiretrovirotik. Antiretrovirotika se podávají v léčbě akutní (primární) infekce HIV i v jejím dalším průběhu a rovněž za účelem profylaxe infekce HIV. Pro zahájení léčby musí být splněny následující podmínky:

1. stanovení virové nálože
2. vyšetření CD4+ lymfocytů
3. zahájení profylaxe oportunních infekcí u pacientů s těžkým imunodeficitem (CD4+ lymfocyty < 200/μl)
4. ochota pacienta k léčbě
5. momentální dostupnost konkrétních léků na trhu

Léčba antiretrovirotiky je náročná, obvykle se používají definované kombinace léků s ohledem zejména na tíhu infekce (hodnota CD4+), nežádoucí účinky, alergie, rezistence viru, celkový fyzický stav pacienta, a další okolnosti, zejména přítomnost těhotenství, infekce TBC, virové hepatitidy, poškození některých orgánů, především jater, ledvin.

### ***5.1 Typy antiretrovirové léčby***

existuje 6 hlavních typů léků podle způsobu účinku.

1. Inhibitory vstupu
2. Inhibitory fúze
3. Inhibitory reverzní transkriptázy (NRTIs nukleosidový inhibitor reverzní transkriptázy, NNRTIs nenukleosidový inhibitor reverzní transkriptázy)
4. Inhibitory integrázy
5. Inhibitory proteázy
6. Multi-class kombinace produktů

#### *Nežádoucí účinky podle typu antiretrovirotik*

NRTI: hematotoxicita, gastrointestinální potíže, pankreatitida, laktátová acidóza

NNRTI: gastrointestinální intolerance, exantém, jaterní selhání, neuropsychické příznaky.

Inhibitory proteinázy: gastrointestinální intolerance, průjem, lipodystrofie, hypertriglyceridémie, hypercholesterolémie, snížená tolerance glukózy vedoucí až k DM.

Klinicky významné jsou převážně léky inhibující proteinázy a některé NNRTI. Některé léky inhibující cytochromové enzymy zvyšují hladinu inhibitorů proteinázy. Z tohoto důvodu musí kompletně vést antiretrovirovou terapii specialista.

Tabulka 2: Nejčastěji používané léky při terapii HIV infekce

Zkratka	Účinná látka	Chemický ekvivalent	Způsob účinku	Možné NÚ	Zdroj
TDF	Tenofovir	9-(2-fosfomethoxypro-pyl) adenin	NRTI a polymerázy	Poškození ledvin, zejm. tubulů (až Fanconiho sy.), to může vést k poklesu kostní denzity, laktátová acidóza, jaterní steatóza	<a href="https://www.drugbank.ca/drugs/DB00300">https://www.drugbank.ca/drugs/DB00300</a> AISL-NNB (PL)
FTC	Emtricitabin	2'3'-dideoxy-5-fluoro-3'-thiacytidin	NRTI	Inzulínová rezistence (hyperglykemie), dyslipidemie, leukocytopenie, pošk. Jater, slinivky, anemie, edém rtů, jazyka, laktátová acidóza	<a href="http://www.remedia.cz/Clanky/Aktuality/Emtricitabin-tenofovir-fixni-kombinace/6-E-iS.magarticle.aspx">http://www.remedia.cz/Clanky/Aktuality/Emtricitabin-tenofovir-fixni-kombinace/6-E-iS.magarticle.aspx</a> AISLP-NNB (PL) <a href="http://www.aidsmap.com/resources/treatmentsdirectory/drugs/Emtricitabine-FTC-iEmtrivai/page/1731063/">http://www.aidsmap.com/resources/treatmentsdirectory/drugs/Emtricitabine-FTC-iEmtrivai/page/1731063/</a>
3TC	Lamivudin	2',3'-dideoxy-3'-thiacytidin	NRTI	Zánětlivé poškození jater, postižení GIT (průjem, zvracení, bolesti břicha), infekce DS, otoky obličeje, svalové křeče, kožní projevy	<a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/lamivudine#section=Related-Records">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/lamivudine#section=Related-Records</a> AISLP-NNB (PL)
EFV	Efavirenz	6-chlor-4-cyklopropyl ethynyl-4-trifluoromethyl-1,4-dihydro-3,1-benzoxazin-2-on	NNRTI	Kožní projevy, hyper-TAG, psychické poruchy (deprese, úzkost, nespavost, bludy, sklony k sebevraždám!), bolesti hlavy, závratě, potíže GIT (průjem, zvracení, bolest břicha), poškození jater a žlučových cest	WC500121447[1].pdf AISLP-NNB(PL) <a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/efavirenz#section=Names-and-Identifiers">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/efavirenz#section=Names-and-Identifiers</a>

## 6. Stručná fyziologie imunitního systému

Imunitní systém spolu s endokrinním a nervovým systémem se podílí na homeostáze (Bartůňková et al., 2011). Funkci imunitního systému vykonávají jednak humorální faktory, kterými jsou specifické proteiny: složky krevního séra a tkáňového moku. Do humorální imunity patří protilátky, komplement a řada dalších proteinů v séru a do buněčné složky patří krevní a další buňky jako jsou makrofágy, lymfocyty, NK buňky. Produktem těchto buněk jsou cytokiny. Na základě reakce imunitního systému na antigen dělíme imunitní odpověď na specifickou a nespecifickou. Všechny tyto složky spolu úzce spolupracují a vzájemně se ovlivňují.

Nespecifická imunita: komplementový systém, fagocytující buňky a NK buňky. Nespecifická imunita reaguje na přítomnost antigenu rychle. Buněčné složky nespecifické imunity nemají receptory pro antigeny. Mají receptory pro molekuly, které umožní vazbu s antigenem.

Specifická imunita: lymfocyty a protilátky. Při této reakci dochází k imunologické paměti. S antigenem reaguje lymfocyt, který má daný receptor pro příslušný antigen (Bartůňková; Šedivá, 2001).

### 6.1 Primární lymfatické orgány

V primárních lymfatických orgánech buňky imunitního systému vznikají, diferencují a dozrávají. V kostní dřeni vznikají všechny buňky imunitního systému ze společné kmenové buňky. Tato buňka se diferencuje na lymfoidní kmenové buňky a myeloidní kmenové buňky. Erytrocyty, trombocyty, granulocyty, žírné buňky a monocyty vznikají z myeloidní linie. Z lymfoidní kmenové buňky vznikají T-lymfocyty dozrávající v thymu a B-lymfocyty, ze kterých se posléze stávají plazmatické buňky produkující protilátky.

### 6.2 Sekundární lymfatické orgány

V sekundárních lymfatických orgánech a tkáni probíhá imunitní reakce, dozrávání T a B-lymfocytů. Mezi tyto orgány a tkáně patří slezina, lymfatické uzliny a MALT.

Vzniklé lymfocyty opouštějí sekundární lymfatické orgány lymfatickými cévami a dostávají se cirkulací do tkání (Bartůňková et al., 2011).

### **6.3 Buněčné složky imunity**

V buněčné imunitě se uplatňují makrofágy, T-lymfocyty a NK buňky, granulocyty (Bartůňková; Šedivá, 2001). Produkují rozpustné mediátory – cytokiny. Buněčná imunita se uplatňuje při obraně organismu proti bakteriálním, plísňovým a virovým infekcím.

**Nespecifická buněčná imunita:** fagocytující buňky (eozinofilní, neutrofilní granulocyty, makrofágy) mají schopnost fagocytózy. Na membráně mají adhezivní molekuly díky nimž přilnou k endotelu cévní stěny. Receptory, které rozpoznají cizorodou částici, se váží buď přímo, nebo nepřímo. Přímo se receptory váží na struktury mikroorganismů a nepřímo se váží prostřednictvím protilátek či komplementu. Pohlcený mikroorganismus je lyzován řadou enzymů. Tyto enzymy přeměňují kyslík na metabolity s baktericidními účinky. Specifické složky imunity jsou aktivovány různými cytokiny na základě nespecifické složky imunity, které zprostředkovávají i celkovou reakci organismu. Např. IL-1 a 6 a TNF- $\alpha$ , zvýšení teploty a produkce proteinů akutní fáze. Th-lymfocyty, které jsou aktivovány cytokiny, především IL-12, produkují INF  $\gamma$  a tím dojde k aktivaci makrofágů, které jsou schopny ničit pohlcené mikroby (Bartůňková et al., 2011).

: NK buňky patří mezi buňky schopné identifikovat a usmrctvat cílové buňky. Jedná se o velké granulární lymfocyty, které nesou na své povrchu znaky CD56, CD16. Znak CD16 je receptorem pro Fc fragment imunoglobulinů. Rozeznávají buňky, které nenesou HLA molekuly a ničí je. NK buňky produkují INF $\gamma$  a mají regulační a efektorovou funkci (Bartůňková; Šedivá, 2001).

: Žírné buňky a bazofilní leukocyty jsou pro ně typická granula s obsahem histaminu, serotoninu, kininu. Na svém povrchu mají navázané molekuly IgE. Na imunitních reakcích, zejména nespecifických, se podílí i jiné buňky např. buňky gangliové, dendrické buňky apod., které nepatří přímo do složek imunitního systému. Erytrocyty se podílí na vylučování komplexu Ag-Ab



a trombocyty se podílí při alergických a protizánětlivých reakcích (Bartůňková; Paulík, 2011).

**Specifická buněčná imunita:** do specifické imunity patří Th, Tc-lymfocyty. Rozlišujeme několik typů lymfocytů podle funkce. Rozlišují se pomocí adhezivních signálních molekul na membránách. Všechny T-lymfocyty nesou společné znaky CD2 a CD3. Receptor CD3 je součástí receptoru TCR. TCR je receptor, který se váže na Ag nabídnutý buňkou předkládající antigen spolu s molekulami HLA. Th lymfocyty nesou na svém povrchu znak CD4, mají funkci tzv. pomahačů. Lymfocyty CD4<sup>+</sup> rozpoznávají Ag předložený antigenem předkládající buňkou spolu s HLA II. třídy. Podle produkce cytokinů se Th lymfocyty dělí na podtypy označované Th1, Th2, Th3, Th17 a Treg. Th1 lymfocyty produkují převážně IL-2, INF $\gamma$  a jsou typické pro buněčnou imunitu. Th2 lymfocyty produkují převážně IL-4,5,6,10 a jsou typické pro humorální imunitu. Th3 a Treg produkují hlavně IL-10 a TGF- $\beta$  a Th17 mají regulační funkci a produkují IL-17. Tc lymfocyty nesou na svém povrchu znak CD8, mají funkci cytotoxickou a supresorovou. Lymfocyty CD8<sup>+</sup> rozeznávají Ag předložený antigenem předkládající buňkou spolu s HLA I. třídy. Paměťové lymfocyty jsou buňky, které zůstávají v organismu po prvním setkání s Ag. Při opětovném setkání nastupuje rychlejší a účinnější imunitní odpověď. Paměťové lymfocyty T nesou na povrchu znak CD45RO a lymfocyty B mají znaky CD19 a CD62L (Bartůňková; Pavlík, 2011; Jílek, 2014).

#### ***6.4 Humorální složky imunity***

Humorální imunita je zajišťována složkami plazmy: zejména protilátkami a komplementem. Kromě toho se v séru nachází celé řada bílkovin účastnících se při akutní fázi zánětu. CRP, MBL, fibronektin a další. Humorální imunita se uplatňuje v obraně organismu před extracelulárními patogeny.

**Nespecifická humorální imunita:** Komplementový systém je systém plazmatických bílkovin, které jsou produkovány hepatocyty. Celkem se komplement skládá z devíti složek značených C1-C9 a dalších regulačních proteinů. V séru jsou přítomny v neaktivní formě. K aktivaci komplementu dochází různými způsoby. K aktivaci klasické cesty dochází vazbou C1 složky na komplex Ag-Ab. Další cesta

je tzv. cesta alternativní. Tato cesta je vyvolána reakcí C3 např. s enzymem, který je uvolněn při poškození tkáně. Poslední cesta je cesta lektinová. Při lektinové cestě dochází k aktivaci C1 pomocí sérového lektinu, který váže manózu.

Proteiny akutní fáze jsou syntetizovány játry. Induktorem syntézy těchto proteinů jsou cytokiny, zejména IL-6. Hlavním proteinem akutní fáze je CRP, tento protein reaguje na přítomnost zánětu během několika hodin a jeho hodnoty v séru se zvýší až stonásobně v případě bakteriální infekce. Složky komplementu C3, C4, orosomukoid,  $\alpha$ -2-makroglobulin,  $\alpha$ -1-antitrypsin a ceruloplazmin jsou dalšími proteiny akutní fáze s různými regulačními funkcemi (Bartůňková; Šedivá, 2001; Bartůňková; Pavlík 2011).

**Specifická humorální imunita:** Protilátky jsou globulární glykoproteiny zvané imunoglobuliny a jsou tvořeny plazmatickými buňkami, které jsou konečným stádiem vývoje B-lymfocytů. Lymfocyty B mají na svém povrchu antigenně specifické receptory, které jsou tvořeny částí imunoglobulinové molekuly a spolu s dalšími transmembránovými strukturami tvoří komplex BCR. Po střetu s antigenem prezentovaným na APC je, B-lymfocyt je aktivován, přitom se změní na plazmatickou buňku a začne tvořit protilátky. B-lymfocyty mají na svém povrchu znaky CD19, CD20. Imunoglobuliny produkované plazmatickými buňkami mají strukturu uspořádanou do tvaru Y, tvořenou dvěma těžkými řetězci H a dvěma lehkými řetězci L, spojenými disulfidickými můstky mezi dvěma aminokyselinami. Lehké řetězce jsou kratší a shodné. Ig se rozděluje do 5 izotypů IgG, IgM, IgE, IgA, IgD podle Fc fragmentu. Protilátky rozeznávají antigeny velkou rozlišovací schopností. Každá molekula má na vazebných místech pro antigen různé pořadí AMK, tím se liší struktura a také avidita neboli schopnost vázat rozdílné antigeny. Jeden buněčný klon plazmatických buněk produkuje protilátky jednoho izotypu a jedné specifity zvané monoklonální (Bartůňková; Šedivá, 2001; Jílek, 2004).

## **7. Laboratorní diagnostika pro vyšetření buněčné imunity**

Pro vyšetření buněčné imunity je důležité dodržení správného odběru a rychlého transportu krve za předepsaných podmínek do laboratoře. Odběr se provádí do zkumavky s protisrážlivým činidlem  $K_2EDTA$  či  $K_3EDTA$ . Stanovení různých

subpopulací lymfocytů se v dnešní době provádí výhradně průtokovou cytometrií. Zjišťují se povrchové znaky lymfocytů, granulocytů či jiných buněčných typů. Vedle krve je možné vyšetřit i jiné biologické tekutiny jako např. mozkomíšni mok, BAL, a jiné. K diagnostice primárních a sekundárních imunodeficitů se u HIV vyšetřuje hlavně počet CD4+ lymfocytů, hodnoty nám určí tíži imunodeficitu a možnost nasazení antiretrovirové léčby a po čase úspěšnost léčby a míru progresu onemocnění (Bartůňková; Šedivá, 2001; Bartůňková; Pavlík, 2011).

### ***7.1 Průtoková cytometrie***

Podstatou metody je analýza buněk popř. jiných částic v suspenzi. Vyšetřovaná suspenze je značena nejčastěji monoklonální protilátkou s fluorochromem. Tyto monoklonální protilátky s fluorescenční molekulou se váží specificky na antigen na povrchu či uvnitř analyzovaných buněk. Suspenze s takto označenými buňkami je vložena do průtokového cytometru a vstřikována přetlakem přes malý otvor. Tím se vytvoří souvislý tenký proud suspenze. V tomto proudu putují buňky jednotlivě za sebou a jsou protínány laserovým paprskem. Paprsek se odráží od jakékoliv částice v suspenzi do stran a rozptýlí se. Je-li na částici navázána fluorescenční molekula, dochází k vyzáření excitovaného světla. Díky různým monoklonálním protilátkám a různým druhům fluorochromů lze stanovit současně přítomnost více antigenů v každé buňce. Detektory zaznamenávají dva optické parametry Side scatter a Forward scatter (detekují velikost a granularitu buněk) a minimálně dvě hodnoty vyjadřující fluorescenci na různých vlnových délkách. Výsledkem je míra exprese jednotlivých sledovaných znaků v suspenzi. Všechny parametry se zapisují ve formě matice do počítače. Pomocí histogramu se zjišťuje procento pozitivních buněk pro daný parametr, popř. intenzita fluorescence určité subpopulace. Obvyklým výstupem jsou dvojrozměrné grafy dot plot, kde každá buňka je znázorněna tečkou. V případě, že analyzujeme více buněk, je vhodné použít zobrazovací metodu, která nám snadno rozezná větší hustotu. Pro kvantitativní stanovení se vyjadřují procenta pozitivních buněk z určitého gatů (Bartůňková, 2011; Bartůňková; Pavlík, 2011).

## **8. Stanovení HIV *Architect i2000 imunochemický modul***

Pro analýzu a stanovení HIV se používá metoda CMIA na mikročásticích na automatickém analyzátoru. Jedná se o detekční metodu, která měří a kvantifikuje koncentrace analytu, přítomnost antigenů a protilátek. Stanovovaný vzorek je napipetován do kyvety, do které jsou přidány paramagnetické mikročástice s navázanou primární protilátkou. Po přidání probíhá inkubace a promíchávání reakční směsi. Vytvoří se imunokomplex, který je pomocí magnetu přitažen ke stěně kyvety a dalším promytím se odstraní ostatní nenavázané složky séra. Poté je přidána sekundární protilátka (konjugát) značený chemiluminiscenčním akridinem, který se naváže během další inkubace na vytvořený imunokomplex, dojde k dalšímu promytí reakční směsi. Pre-Trigger ( $H_2O_2$ ) a optický systém provede čtení pozadí, přidáním Triggeru (NaOH) dojde k oxidační reakci. Vzniká N-methylakridon, který při návratu do základního energetického stavu vyzáří energii ve formě záření (SOP technický, 2016).

### **8.1.1 Nezbytné sloučeniny pro zpracování metody CMIA**

Paramagnetické částice, které jsou obaleny antigenem, protilátkou či virovými částicemi, dle měřeného analytu. Akridinový konjugát, Pre-trigger, slouží k odštěpení akridinového barviva, vytváří kyselé prostředí a zabraňuje předčasné emisi světla, Trigger.

### **8.1.2 HIV Ag/Ab Combo**

U této metody se zjišťuje kvalitativně přítomnost antigenu HIV p24 a protilátky proti HIV-1 nebo HIV-2 v séru či plazmě. Nerozlišuje se mezi detekcí antigenu HIV p24 a reaktivitou anti-HIV-1, anti-HIV-2. Pro sérodetekci je klíčovým virový transmembránový protein (TMP). Protilátky proti TMP se objevují mezi prvními protilátkami u infikovaných jedinců HIV. antiTMP zůstávají relativně silné po celou dobu onemocnění, jak v asymptomatickém, tak i v symptomatickém stádiu infekce. Metoda Combo používá reagentie s obsahem protilátek anti-HIV p24, díky kterým je detekován antigen HIV p24 ještě před serokonverzí.

### Princip metody

Metoda je dvoukroková imunoanalýza ke stanovení přítomnosti anti-HIV-1 (typy M, O), anti-HIV-2 a antigen HIV p24 využívající CMIA. Množství antigenu HIV a protilátek anti-HIV je přímo úměrné jednotkám RLU (Relative Light Units) detekovaným optickým systémem. Přítomnost či nepřítomnost antigenu HIV p24 či anti-HIV-1, anti-HIV-2 se určuje na základě hodnot chemiluminiscenčního signálu v reakci s hodnotou cut-off. Tato hodnota je vypočtena na základě kalibrace.

### Omezení metody

Tepelně inaktivované vzorky, silná hemolýza, zjevná mikrobiální kontaminace, nedostatečně koagulovaná séra, fibrinová vlákna, erytrocyty a jiné částice, heterofilní protilátky v séru.

#### **8.1.3 Vyhodnocení testů**

Cut-off (CO) = průměrná hodnota kalibrátoru 1 (RLU) \* 0,40

S/CO = hodnota vzorku RLU / hodnota cut-off (RLU)

Vzorky s hodnotami S/CO < 1 jsou považovány za nereaktivní

S/CO ≥ 1 jsou považovány za reaktivní

V případě reaktivity je třeba opakovat vyšetření. Před dalším měřením je zapotřebí provést znovu odstředění vzorku 10 min. při 10000g. Opakovaně zjištěná reaktivita je třeba potvrdit jinou doplňující metodou. Jsou-li výsledky jednoho či druhého retestu reaktivní předpokládá se přítomnost antigenu či protilátky a výsledek je potřeba zaslat ke konfirmačnímu vyšetření do SZÚ NRL pro AIDS a do výsledku se vloží příkaz uvolnění: zaslán ke konfirmačnímu vyšetření. Jsou-li oba retesty nereaktivní je vydán výsledek jako negativní.

Vzorky ke konfirmačnímu vyšetření se musí separovat a odpipetovat do alikvotní zkumavky opatřené štítkem s ID pacienta a spolu s originálním formulářem pro konfirmační vyšetření je odeslána do SZÚ (Příbalová informace, May 2014; SOP HIV, 2015).

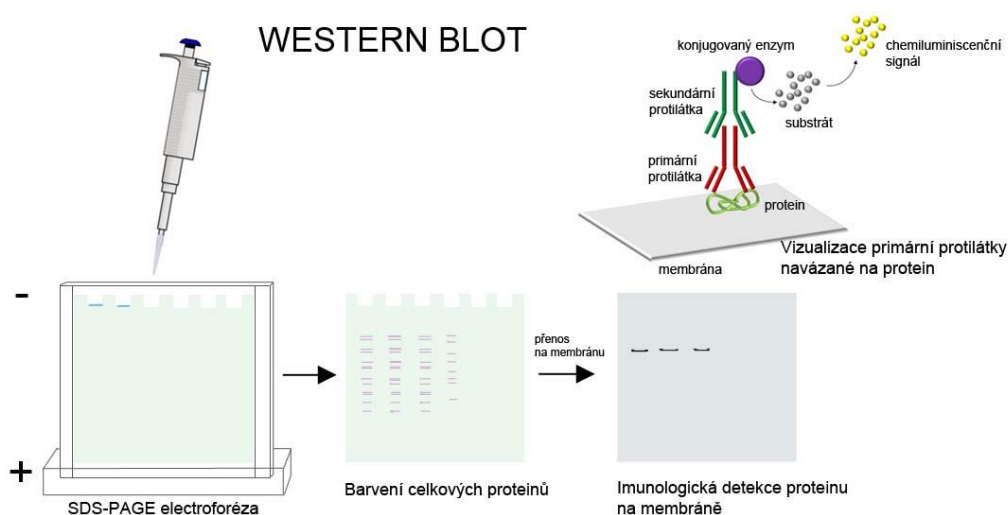
V období od 1. ledna 2015 do 1. ledna 2017 bylo celkem na oddělení klinické biochemie v NNB vyšetřeno 5022 vzorků ke kvalitativnímu stanovení přítomnosti antigenu HIV p24, anti-HIV-1 nebo anti-HIV-2. Z celkového množství vyšetřovaných vzorků byla u 74 z nich zjištěna reaktivita a odeslána ke konfirmačnímu vyšetření do SZÚ NRL pro AIDS. U celkem 4943 byla reaktivita negativní a u 5 zbývajících nebylo vyšetření provedeno z různých důvodů nedodržení podmínek preanalytické fáze.

Konfirmační vyšetření patří mezi citlivé metody pro ověření reaktivních výsledku získaných ze screeningového vyšetření v laboratořích v ČR včetně transfúzních služeb. (SZÚ NRL pro AIDS)

#### Konfirmace HIV v NRL:

1. použijí se dva běžné testy odlišné od testu provedeného při screeningu. V případě, že oba budou negativní = NEGATIVNÍ
2. vykazují-li pozitivitu, použijí se další testy, individuální postup dle výsledku předchozích testů.
  - a) detekce virové RNA metodou PCR (používá se při podezření na akutní infekci)
  - b) Western blott pro detekci proteinu p24 nebo protilátek. Pokud je p24-Ag pozitivní, pak se provádí neutralizační test.

Obrázek 2: Western blot: postup provedení testu



Zdroj: <http://labguide.cz/metody/western-blot/>

- c) Imunochromatografie rozlišuje protilátky anti-HIV-1 nebo anti-HIV-2
3. pokud je výsledek nejasný, může být způsobeno nespecifickou reakcí nebo velmi krátkou dobou po vniknutí agens do organismu. V těchto případech je vyžádán opakovaný odběr, obvykle za 1 – 4 týdny.
  4. u dárců krve nebo ze zákona vyžádaném testu se používá vždy western blott.

## Praktická část

### 9. Laboratorní diagnostika biochemických markerů z krve HIV pozitivních pacientů *Laboratorní vyšetření*

Pro správnou laboratorní práci je velmi důležité dodržení preanalytických, analytických a postanalytických podmínek. V preanalytické části je důležitá příprava pacienta, samotný odběr, uchovávání a transport vzorků za předepsaných podmínek. Typ odběrového systému je závislý na druhu požadovaného vyšetření. Analytická fáze je prováděna laboratorně v souladu s postupy správné laboratorní práce a eliminování chyb díky zavedené interní a externí kontrole kvality. Komunikace a spolupráce laboratoře s indikujícím lékařem, interpretace výsledků s referenčními hodnotami a jiná interdisciplinární spolupráce jsou částí postanalytickou (Zima, 2002).

Postup odběru a transport u následujících vybraných biochemických markerů, které jsou vyšetřovány v rámci monitorování stavu pacientů během jejich terapie, zejména monitorování dopadu nežádoucích účinků antiretrovirotik.

Sérum	Plazma NaF+EDTA	K <sub>2</sub> EDTA
Glykemie [mmol/l]	Laktát [mmol/l]	WBC abs. p.
Bilirubin Total [μmol/l]		Lymfocyty %
AST [μkat/l]		T-lyCD3
ALT [μkat/l]		T-lyCD3 %
ALP [μkat/l]		CD3/CD4
GGT [μkat/l]		CD3/CD4 %
Cholesterol [mmol/l]		CD3/CD8
HDLC [mmol/l]		CD3/CD8 %
LDH [μkat/l]		CD1656
TAG [mmol/l]	Moč	CD16CD56 %
Urea [mmol/l]	chemicky	LyCD19
Kreatinin [μmol/l]	morfologicky	LyCD19 %
Cl [mmol/l]		
Na [mmol/l]		
K [mmol/l]		
Amyláza [μkat/l]		
CRP [mg/l]		
MDRD [ml/s]		

Tabulka 3: Běžně vyšetřované metody na OKBI v NNB

Z celkového panelu vyšetřovaných analytů bylo vybráno 5 markerů pro bližší seznámení a rozbor: laktát, celkový cholesterol, triacylglyceroly, HDL cholesterol a LDL cholesterol.



Veškerá stanovení biochemických markerů se provádí na plně automatizovaných analyzátoch.

### **9.1.1 Plně automatický analyzátor Architect**

Výrobce analyzátoru je Abbott Laboratories, Diagnostics division. Analyzátor je složený z několika jednotek tvořících jeden systém. Primární součástí systému je biochemický a imunologický modul, podavač vzorků a řídicí jednotka systému.

#### *9.1.1.1 Biochemický modul*

Měření biochemických markerů probíhá dnes již na plně automatizovaných analyzátoch, které nám umožňují simultánně vyšetřit řadu analytů včetně stanovení iontů pomocí iontově selektivní elektrody (ISE). Principem měření je fotometrie a k měření iontů (Na, Cl, K) systém využívá ISE z pevné fáze integrovanou do jednoho kompaktního modulu (ICT modul). Výsledky absorbance a potenciálu jsou vyhodnoceny z kalibračních křivek a převedeny na jednotky. Vyhodnocená a převedená data jsou odesílána do laboratorního informačního systému (LIS).

#### *9.1.1.2 Imunochemický modul*

Plně automatický analyzátor k imunochemickým analýzám nádorových markerů, hormonů, hepatitid, protilátek HIV a některých dalších analytů. Pro stanovování využívá chemiluminiscenční metody na mikročasticích (CMIA). Výsledky jsou vyhodnoceny z kalibrační křivky a převedeny na požadované jednotky. Vyhodnocená a převedená data jsou odeslána do LIS.

## KALIBRACE

Pro kalibraci a provedení aktivní kalibrační křivky se používají kalibrační sety přímo od výrobce. Kalibrace se provádí vždy při nainstalování nového systému metod, v pravidelných intervalech, před použitím nové šarže reagentie, při opakovaně neúspěšné kontrole kvality, po významném servisním zásahu či po výměně komponenty přístroje, které mohou mít vliv na kvalitu vyšetření.

## INTERNÍ KONTROLA KVALITY (QC)

Interní kontrola kvality se provádí pravidelně vždy před zahájením ranního provozu, mimo to se provádí vždy po kalibraci, při podezření na chybné výsledky, výrazném servisním zásahu, výměně důležité komponenty. V případě neúspěšné QC (CNTL 1-2s; CNTL 1-3s) musí být opakována, v případě opakovaného neúspěchu se postupuje dle pracovního postupu (SOP technický, 2015).

### ***9.2 Požadavky na odběr jednotlivých biochemických markerů a vyšetření HIV***

Laktát: požadovaný vzorek je plazma, odebraná do odběrového systému bez gelového separátoru s protisrážlivým činidlem fluoridem sodným a oxalátem (šedý uzávěr – BD Vacutainer) a fluoridem sodným (žlutý uzávěr – Sarstedt). Při odběru se nepoužívá komprese manžetou, vzorek musí být transportován na ledu a co nejdříve do laboratoře ke zpracování. Plazmu je nutné oddělit do 15 min. po odběru.

Cholesterol, TAG, HDL, LDL: odběr se provádí do zkumavek bez úprav anebo také může být použit odběr plazmy do heparinu. Odběr se provádí pacientům, kteří jsou na lačno, lačnění před odběrem by mělo být alespoň 12 hodin a komprese manžetou co nejkratší dobu.

HIV: Vyšetření HIV lze provádět pouze se souhlasem fyzické osoby. Test na HIV se musí provádět pravidelně u dárců krve, orgánů, spermatu, mateřského mléka, tkání. Bez souhlasu fyzické osoby se vyšetření provádí dle zákona č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů § 71, u těhotných žen, u obviněných osob z ohrožování a šíření pohlavní nemoci, u osoby, která je nuceně léčena z pohlavní nemoci a u osob s poruchou vědomí, pro které je vyšetření HIV důležité z hlediska diagnostiky. Odběr lze provádět do zkumavek bez úprav, do plazmy draselné soli EDTA, sodné soli heparinu, Li-Heparinu, citrátu sodného, šřavelanu

draselného, separační zkumavky na plazmu. Transport musí být v souladu s danými předpisy pro přepravu vzorků a infekčních látek.

## **10. Biochemický analyzátor Architect ci8200**

### ***10. Fotometrická metoda***

Principem fotometrie je měření množství elektromagnetického záření o přesně definované vlnové délce v oblasti UV-VIS, které je vzorkem absorbováno. Fotometrie zahrnuje průchod světelného toku vzorkem a následné měření intenzity světla dopadajícího na detektor. Energie zachyceného světla se přeměňuje na energii elektrickou. Míra absorpce roztoku a koncentrace analytu je dána Lambert-Beerovým zákonem. Měření je prováděno ve chvíli, kdy je reaktant spotřebován a reakce se nachází v ustáleném stavu (metoda s měřením v koncovém bodě) anebo v případě, že dojde k ustálení změny koncentrace reaktantu nebo produktu, je měřena konstantní změna absorpce za určitý časový interval (kinetická metoda).

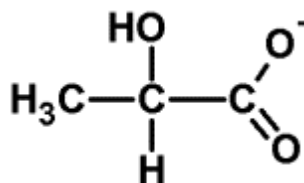
#### ***10.1 Optické měření***

Měření změn absorpce v průběhu reakce se využívá wolfram-halogenové lampy vyzařující světlo, které prochází kyvetou po zaostření konvexní čočkou. Po zaostření světla druhou konvexní čočkou dopadá na zrcadlo a odráží se na difrakční mřížku. Tato mřížka rozkládá paprsek na 16 vlnových délek a odráží světelné spektrum na fotodiodové pole, které měří intenzitu světla při různých vlnových délkách. Signál z fotodiodového pole je zesílen soustavou fotonásobičů a poté přepočítán na hodnoty transmitance. Řídící jednotka systému obdrží pro každou kyvetu hodnoty transmitance, určí měření nutná pro výpočet jednotlivých metod a poté převádí transmitanci na hodnoty absorpce. Hodnoty absorpce jsou na základě aktuální kalibrační křivky převedeny na hodnoty koncentrací jednotlivých analytů (SOP technický, 2015).

## 10.2 Biochemické markery

### 10.2.1 Laktát

Obrázek 3: chemický vzorec laktátu



Zdroj: SOP/SOP pro laboratorní vyšetření

Laktát je konjugovaná báze kyseliny mléčné při neutrálním pH. Konečným produktem anaerobní glykolýzy je laktát. Aby mohla anaerobní glykolýza probíhat je zapotřebí regenerovat vznikající NADH redukcí pyruvátu na laktát, tato reakce je katalyzována enzymem laktátdehydrogenázy (SOP laktát, 2015).

Hodnoty laktátu patří mezi pravidelně stanovované parametry.

Při zvýšené hladině dochází k laktátové acidóze, která se dělí na dva typy:

- typ A způsobený insuficiencí na úrovni mitochondrií. Typ A je spojený s tkáňovou hypoxií.
- typ B bez přítomnosti tkáňové hypoxie, vyvolána podáním látek, jež ovlivňují intermediární metabolismus. U subtypu B3 je laktátová acidóza vyvolána vrozenými poruchami (Zima, 2007; Kazda, 2012).

Laktát vzniklý glykolýzou je transportován krví do jater, kde je glukoneogenezí syntetizován na glukózu. Ta je zpět transportována krví do tkání, které nemohou využívat dýchací řetězec. Laktát je aerobně odbouráván z části v játrech a tím je získána energie ve formě ATP. V krvi se nachází za normálních podmínek jen malé množství laktátu. (Příbalový leták, leden 2016).

#### Referenční rozmezí

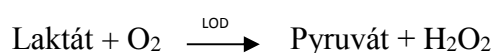
0,6 – 2,4mmol/l

### Omezení metody

Hemolytické vzorky, zvýšená hladina bilirubinu, zvýšená hladina N-acetyl-L-cysteinu a vzorky obsahující kyselinu glykolovou.

### Princip metody stanovení laktátu

Laktát je enzymem laktát oxidázou (LOD) oxidován na pyruvát a peroxid vodíku. Peroxidáza (POD) katalyzuje reakci mezi peroxidem vodíku a prekurzorem chromogenu za vzniku barevné látky. Nárůst absorbance při vlnové délce 572nm je úměrný koncentraci laktátu ve vzorku (Příbalový leták, leden 2016).

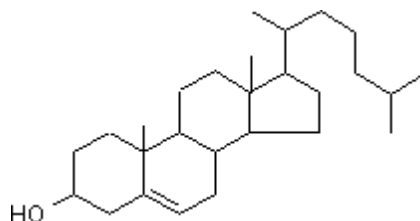


### **10.2.2 Lipidy**

Jedná se o heterogenní látky nerozpustné nebo pouze částečně rozpustné ve vodě. Mají strukturní a ochrannou funkci. Z hlediska klinické biochemie se lipidy mohou dělit na jednoduché (cholesterol a jeho estery, TAG a MK) a složené (fosfolipidy, glykolipidy). A podle fyzikálně-chemických vlastností se mohou plazmatické lipidy dělit na polární (fosfolipidy) a nepolární (cholesterylestery, TAG) tvořící jádro lipoproteinových částic (Zima, 2007). Hodnoty lipidů patří mezi rutinně vyšetřované metody.

### 10.2.3 Cholesterol

Obrázek 4: chemický vzorec celkového cholesterolu



Zdroj: SOP/SOP pro laboratorní vyšetření

Sumární vzorec:  $C_{27}H_{46}O$

Cholesterol patří mezi steroly, v lidském organismu se vyskytuje buď ve volné, nebo esterifikované formě. Je syntetizován po celém těle a je nezbytnou složkou buněčných membrán a lipoproteinů. Je prekurzorem pro syntézu steroidních hormonů a žlučových kyselin. Tvoří se převážně v játrech a střevní stěně. Pro jeho velmi malou rozpustnost ve vodě je transportován v plazmě jako komplex s apolipoproteiny. Rozlišují se lipoproteiny s vysokou, nízkou a velmi nízkou hustotou. HDL (High Density Lipoprotein) transportuje přebytečný cholesterol do jater. LDL (Low Density Lipoprotein) transportuje cholesterol do buněk. VLDL (Very Low Density Lipoprotein). LDL cholesterol je počítaná metoda, která se vypočítá dle Friedewalda = Cholesterol celkový – Triacylglycerol 0,37 – HDL cholesterol. Pro výpočet LDL cholesterolu musí být hodnota TAG pod 4,5mmol/l. V případě hodnoty TAG nad 4,5 mmol/l se provádí přímé měření LDL (Thomas, 1998; Sedláček, 2006; Trojan, 2006).

#### Referenční hodnoty

2,9 – 5,0mmol/l

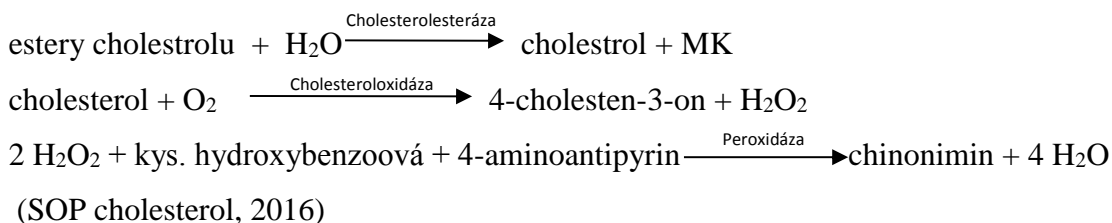
#### Omezení metody

Hemolytické vzorky, silně chylozni vzorky.

#### Princip metody stanovení celkového cholesterolu

Esterifikovaný cholesterol je hydrolyzován pomocí enzymu cholesterolesterázy. Volný cholesterol se oxiduje cholesteroxidázou na 4-cholesten-3-on a současně

dochází k produkci H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Peroxid vodíku následně reaguje s 4-aminoantipyrinem a kyselinou hydroxybenzoovou za přítomnosti peroxidázy za vzniku chinoniminového barviva. Nárůst absorbance při vlnové délce 500nm.



### 10.2.4 HDL cholesterol

Vzniká v játrech a v tenkém střevě. Jsou tvořeny fosfolipidovou dvojvrstvou a apolipoproteiny. Hlavní funkcí HDL je vychytávání cholesterolu z periferních tkání a transport do jater tzv. reverzní transport cholesterolu.

#### Referenční hodnoty

Muži od 15 let: 1,0 – 2,1mmol/l

Ženy od 15 let: 1,2 – 2,7mmol/l

#### Omezení metody

Koncentrace TAG nad 10 g/l, vzorek je třeba naředit fyziologickým roztokem a měření zopakovat.

#### Princip metody stanovení HDL cholesterolu

Metoda je připravená k přímému stanovení HDL cholesterolu v séru či plazmě. Princip metody je založen na urychlení reakce cholesteroxidázy s non-HDL neesterifikovaným cholesterolem a na selektivním rozpuštění HDL cholesterolu za použití specifického detergentu.

### 10.2.5 Triacylglyceroly

Jedná se estery vyšších mastných kyselin a glycerolu. Třemi nejhlavnějšími mastnými kyselinami jsou kyselina stearová, palmitová a nenasycená kyselina olejová. Triacylglyceroly patří mezi nejvýznamnější formu uchování energie v organismu. V krvi jsou vázány výhradně na lipoproteiny. Při spalování se štěpí až na CO<sub>2</sub> a vodu a poskytují až dvojnásobně vyšší množství energie než glukóza a bílkoviny. Zvýšená koncentrace se považuje za rizikový faktor aterosklerózy, nachází se i u lidí s kardiovaskulárními chorobami, u nefrotického syndromu, u diabetes mellitus, u jaterních onemocnění, u pankreatitidy. Stanovení koncentrace triacylglycerolů je důležité pro diagnózu a léčení hyperlipidémie, pro klasifikaci různých genetických a lipoproteinových poruch.

#### Referenční hodnoty

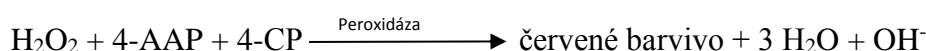
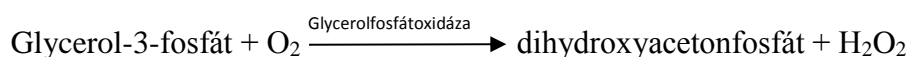
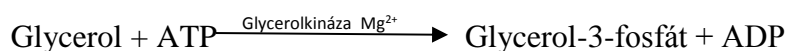
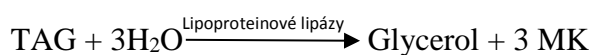
0,45 – 1,70mmol/l

#### Omezení metody

Silná iktericita, nepoužívat odběrový systém se zátkami potaženými glycerolem.

#### Princip metody stanovení triacylglycerolů

První fáze dochází k hydrolýze katalytickým působením lipáz za vzniku mastných kyselin a glycerolu. Uvolněný glycerol je působením enzymu glycerolkinázy a Mg<sup>2+</sup> iontů fosforylován ATP za vzniku glycerol-3-fosfátu a ADP. Glycerol-3-fosfát je dále oxidován kyslíkem na dihydroxyacetonfosfát a peroxid vodíku. Vzniklý peroxid vodíku reaguje s 4-aminoantipyrinem (4-AAP) a 4-chlorfenolem (4-CP) za katalýzy peroxidázou za vzniku červeného barviva (SOP TAG, 2016).





## 11. Imunofenotypizace jednotlivých subpopulací T-lymfocytů z krve HIV pozitivních pacientů na přístroji BD FACSCanto II

### Princip metody

Průtokovým cytometrem jsou buňky vedeny v řadě za sebou přes laserový paprsek. Toho se dosáhne injektováním buněk do tlakového proudu nosné kapaliny – disentu, který je směřován přes průtokovou kyvetu k analýze. Nosná kapalina BD FACSCFlow je vyrobena pro pozadí s nízkým počtem částic a nízkou fluorescencí k zajištění dobrého poměru naměřeného signálu a šumu během procesu analýzy (SOP pro laboratorní vyšetření, 2016).

### *11. Používané lasery a detekce fluorescence dle používaného typu laseru*

V přístroji se nacházejí 3 typy laserů pro vlnové délky 488nm, 633nm a volitelný pro 405nm (Pokyny k použití, 2006).

*Tabulka 4: Typy fluorochromů*

Typy fluorochromů	Rozsah vlnových délek	Laser
FITC	515-545nm	488nm
Pe-Cy	750-810nm	488nm
PerCP-Cy	670-735nm	488nm
PE	564-606nm	488nm
APC	650-670nm	633nm
APC-Cy7	750-810nm	633nm

### ***11.1 Požadované reagensie***

1. BD Multitest 6-color TBNK Reagent obsahující monoklonální protilátku značnou fluorochromy: CD45-PerCP-Cy, CD3-FITC, CD4-PE-Cy, CD8-APC-Cy7, CD16, 56-PE, CD19-APC
2. BD Cytometer Setup& Tracking Beads: kalibrační kuličky
3. BD FACS Lysing Solution: lyzační roztok k lýze erytrocytů (před použitím se ředí injekční vodou 1:10)
4. BD Multi-Check CD4+ Low control: obsahuje lidské leukocyty a erytrocyty ve stabilizovaném mediu.

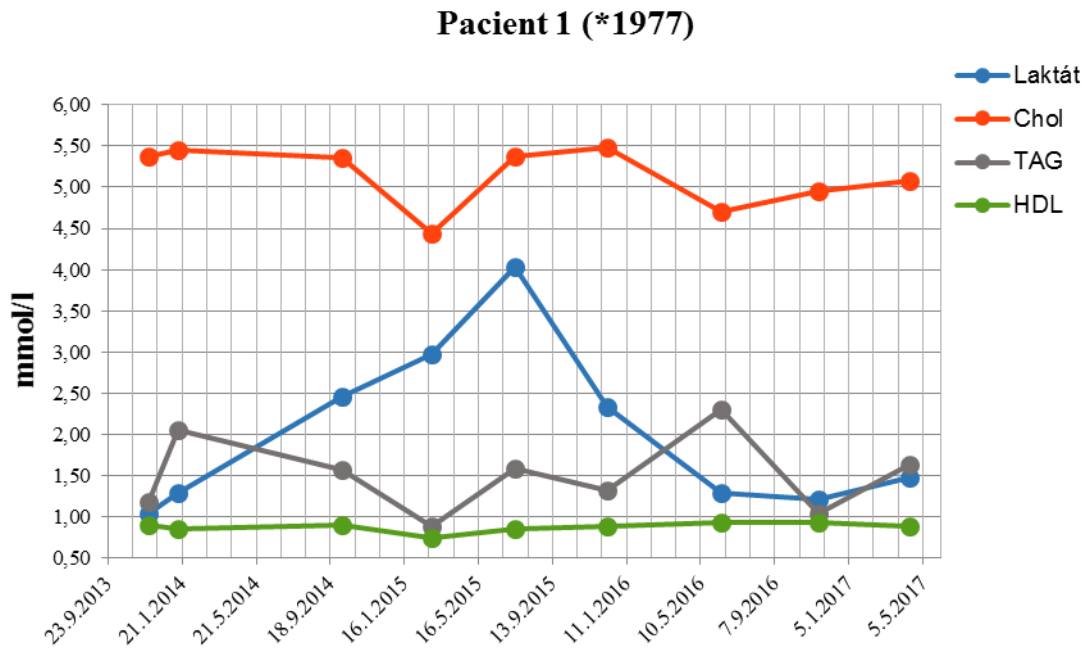
### ***11.2 Kalibrace a kontrola kvality***

Po zapnutí přístroje a BD FACSCanto softwaru se automaticky nastaví napětí detektorů, provede se nastavení laserů CST-Tracking Beads dle pokynů výrobce. Naředí se sedmibarevné kalibrační kuličky (1 kapka + 350µl BD FACS Flow) a vloží se pod odsávací rameno. Po úspěšné kalibraci se vloží kontrolní vzorek BD Multi-Check CD4 Low control připravený dle postupu zpracování vzorků. V případě úspěšné interní kontroly kvality může začít měření vzorků.

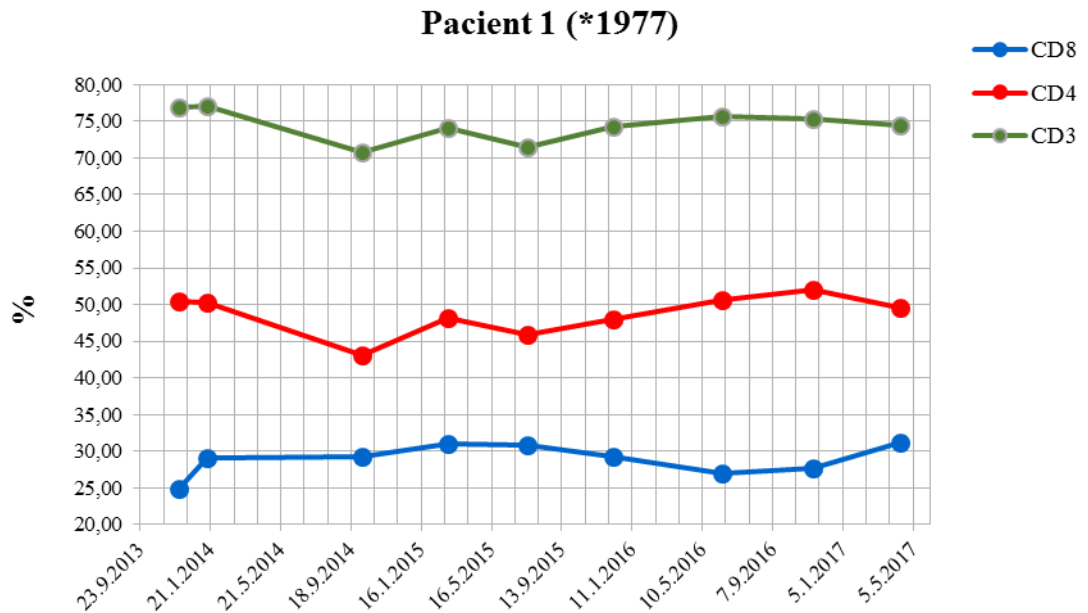
### ***11.3 Vlastní zpracování vzorků***

Krev odebraná do zkumavky s protisrážlivým činidlem K<sub>3</sub>EDTA se po příjmu a zkontrolování veškerých údajů odnese do příslušné laboratoře. Krve pacientů se srovnají spolu s alikvotními zkumavkami podle pipetovacího listu a nechají se 15 minut míchat. Během této doby se zanesou údaje o pacientech do softwaru BD FACSDiva a dopíší se hodnoty lymfocytů a leukocytů dle vyšetřeného krevního obrazu. Do připravených alikvotních zkumavek se v laminárním boxu napipetuje 5µl monoklonální protilátky a přidá se 25µl plně žilní krve pacienta. Obsah se promíchá a nechá se inkubovat 15 minut ve tmě. V dalším kroku se přidá 250µl lyzačního roztoku a nechá se znovu inkubovat 15 minut ve tmě. Po inkubaci se vzorek promíchá a změří na průtokovém cytometru BD FACS Canto II. Výsledný gate se kontroluje, popř. upraví a výsledky se pošlou do LIS.

Graf 1: Vybrané biochemické markery



Graf 2: Jednotlivé subpopulace T-lymocyťu



### Graf 1, 2: Pacient 1 (\*1977)

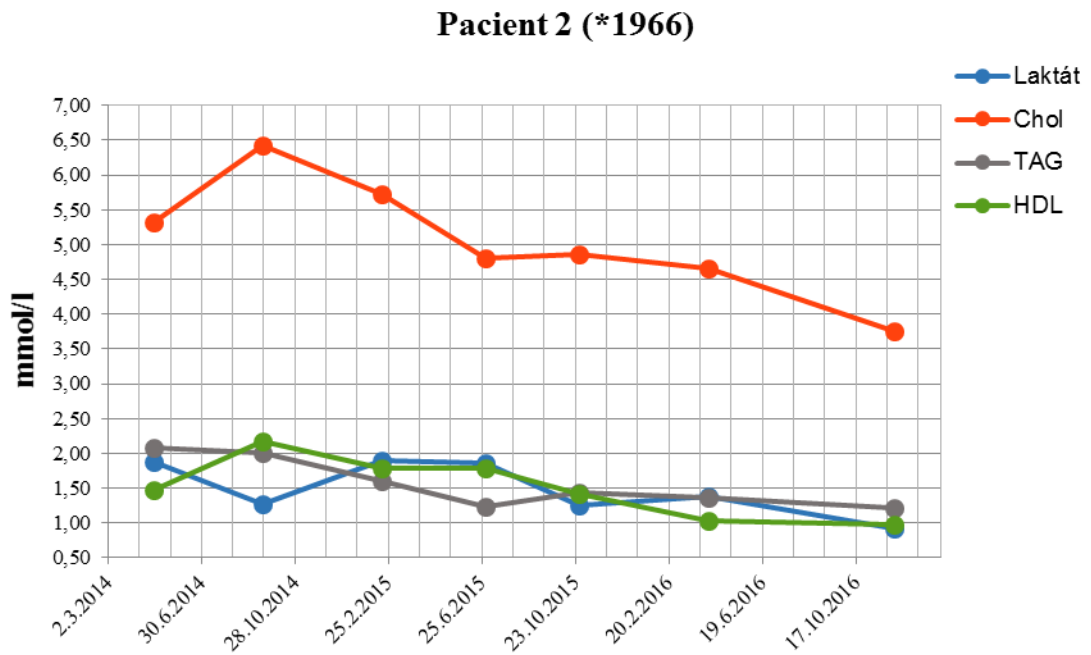
Pacient léčen od roku 2009, HIV typu A1, do roku 2014 pokles CD4 vede ke změně léčby z nukleosidových inhibitorů reverzní transkriptázy a inhibitorů HIV proteáz na nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy a inhibitor integrázy (Viread, Entriva, Kaletra a Issentress, Truvada).

Zřejmě v důsledku změny léčby dochází ke změně trendů a nadměrnému nárůstu podílu CD4 až do roku 2017, kde je opět zaznamenán mírný pokles. Časový průběh CD3 ve sledovaném období kopíruje průběh CD4. U pacienta je do poloviny roku 2015 pozorován výrazný nárůst laktémie až k hodnotě 4 mmol/l a následnému opětovnému poklesu na fyziologické hodnoty do konce roku 2015. Z dostupných lékařských dokumentů nebylo možné odvodit příčinu, proč tomu tak bylo.

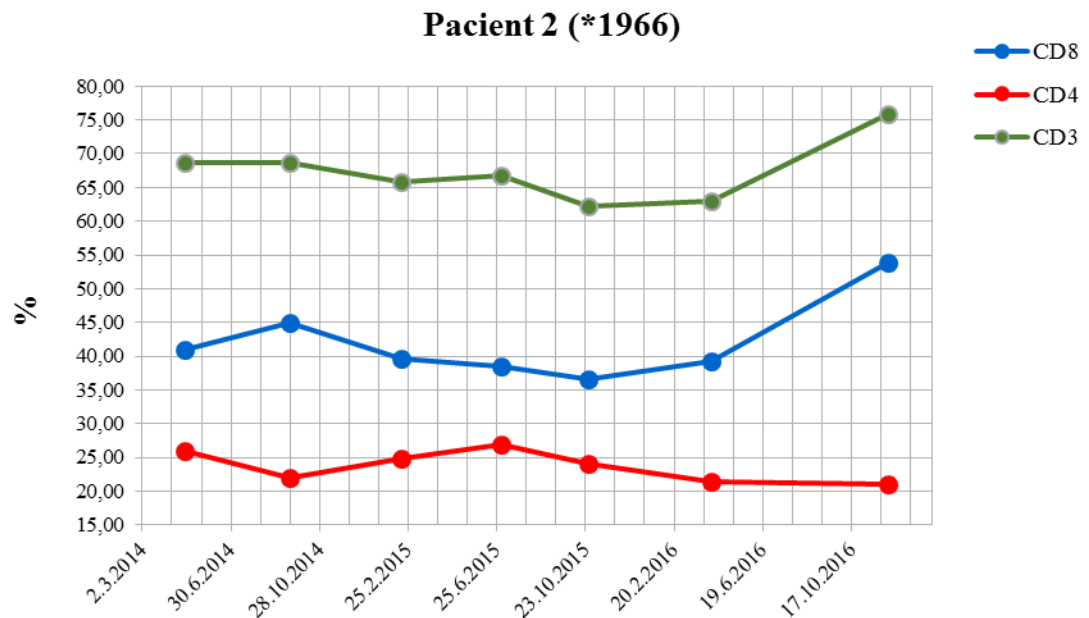
Tabulka 5: Naměřené hodnoty

Pacient 1	Laktát [mmol/l]	Chol [mmol/l]	TAG [mmol/l]	HDL [mmol/l]
27. 11. 2013	1,05	5,38	1,18	0,91
14. 01. 2014	1,29	5,45	2,06	0,86
07. 10. 2014	2,46	5,36	1,58	0,90
02. 03. 2015	2,97	4,44	0,88	0,74
15. 07. 2015	4,03	5,38	1,59	0,86
10. 12. 2015	2,33	5,48	1,32	0,89
13. 06. 2016	1,30	4,70	2,31	0,93
16. 11. 2016	1,21	4,95	1,05	0,94
13. 04. 2017	1,48	5,08	1,64	0,88
Pacient 1	CD8 [%]	CD4 [%]	CD3 [%]	
27. 11. 2013	24,93	50,44	76,85	
14. 01. 2014	29,11	50,23	77,06	
07. 10. 2014	29,25	43,10	70,83	
02. 03. 2015	30,99	48,22	74,07	
15. 07. 2015	30,81	45,90	71,51	
10. 12. 2015	29,21	47,95	74,26	
13. 06. 2016	26,91	50,66	75,69	
16. 11. 2016	27,65	52,00	75,32	
13. 04. 2017	31,18	49,59	74,44	

Graf 3: Vybrané biochemické markery



Graf 4: Jednotlivé subpopulace T-lymfocytů



### Graf 3, 4: Pacient 2 (\*1966)

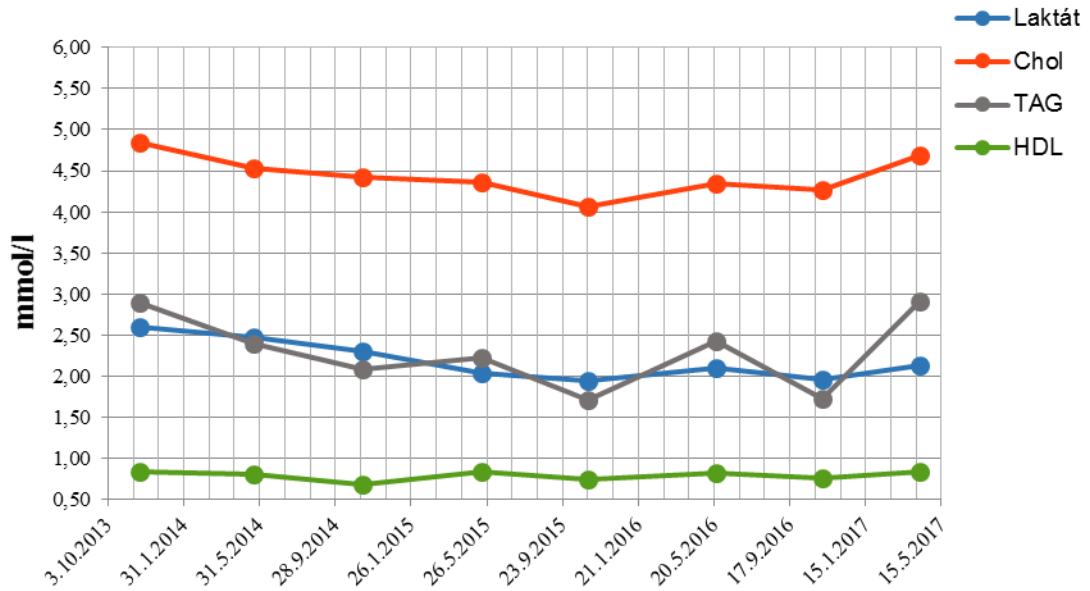
Pacient trpící od roku 2014 mnohočetnými infekcemi (HCV, syfilis) léčen přípravky na bázi nenukleosidových a nukleosidových inhibitorů reverzní transkriptázy. (Stocrin, Viread, Entriva) U pacienta byla zpočátku pozorovaného období zjištěna dyslipidémie. Z grafu je patrný neustálý nárůst cholesterolu od poloviny roku do druhé poloviny roku 2014 až doposud, průběžný pokles je patrný i u HDL a TAG. Hodnoty CD3 a CD8 lymfocytů vykazují stálé hodnoty, až mírný pokles, v posledním měření došlo k výraznému nárůstu těchto subpopulací, zatímco CD4 při posledním měření poklesly.

V první polovině roku 2016 došlo ke změně léčby pomocí léčiv nenukleosidových inhibitorů integrázy což může souviset se změnami hodnot subpopulací T-lymfocytů.

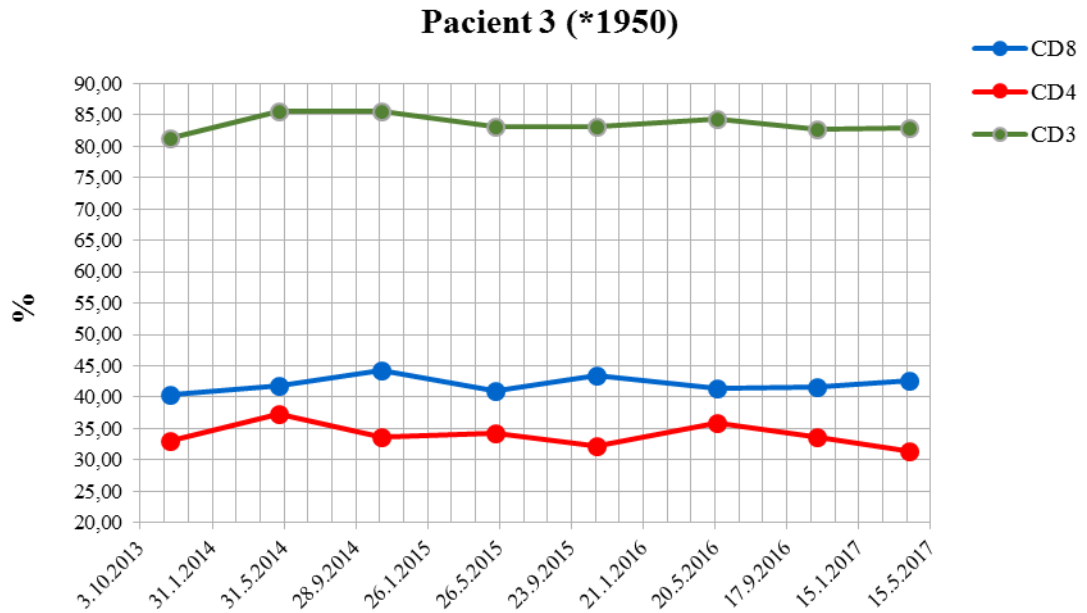
Tabulka 6: Naměřené hodnoty

Pacient 2	Laktát [mmol/l]	Chol [mmol/l]	TAG [mmol/l]	HDL [mmol/l]
29. 04. 2014	1,88	5,32	2,08	1,47
17. 09. 2014	1,28	6,42	2,00	2,18
16. 02. 2015	1,89	5,73	1,61	1,79
30. 06. 2015	1,86	4,80	1,24	1,78
27. 10. 2015	1,26	4,86	1,44	1,42
11. 04. 2016	1,38	4,65	1,37	1,04
06. 12. 2016	0,93	3,76	1,21	0,98
Pacient 2	CD8 [%]	CD4 [%]	CD3 [%]	
29. 04. 2014	41,01	25,97	68,61	
17. 09. 2014	45,01	21,89	68,65	
16. 02. 2015	39,68	24,81	65,84	
30. 06. 2015	38,57	26,90	66,76	
27. 10. 2015	36,63	24,03	62,21	
11. 04. 2016	39,31	21,50	63,03	
06. 12. 2016	53,90	20,94	75,97	

Graf 5: Vybrané biochemické markery



Graf 6: Jednotlivé subpopulace T-lymocyťů



### Graf 5, 6: Pacient 3 (\*1950)

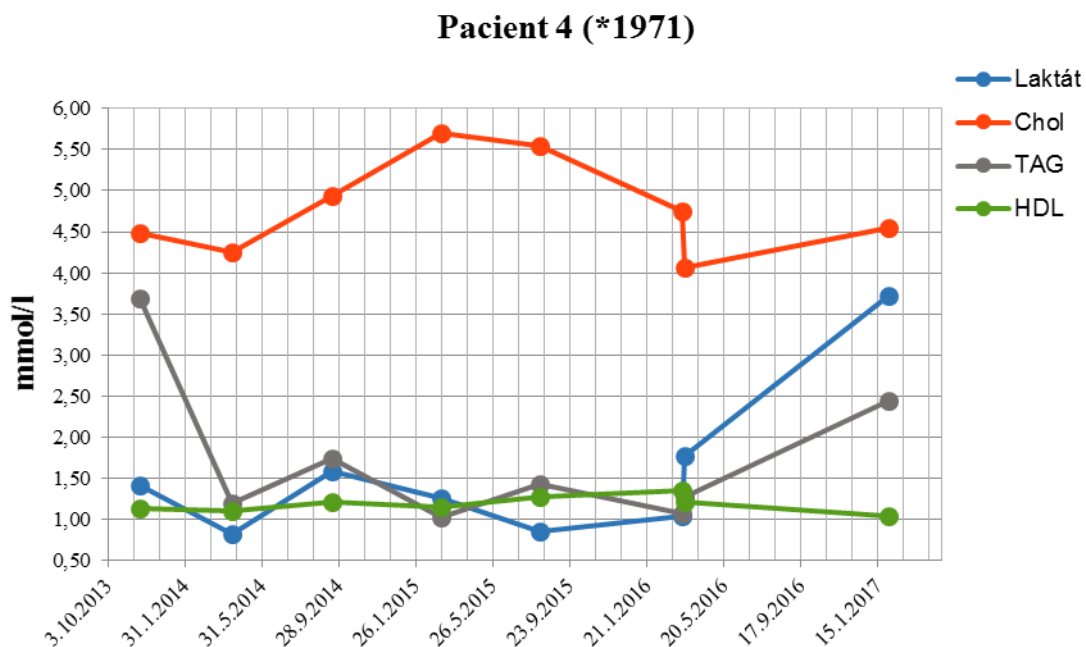
Pacient je léčen od roku 2009 kombinací nukleosidových a nukleotidových inhibitorů reverzní transkriptázy. Z grafu vyplývá, že zastoupení jednotlivých subpopulací T-lymfocytů se během sledovaného období nemění z čehož lze usuzovat na dobrou efektivitu léčby. I přesto je v dokumentaci záznam o změně podávaných antivirotik z důvodu hypetriacylglycerolémie v roce 2014. V grafu je patrný signifikantní pokles koncentrace TAG mezi lety 2013 – 2015, poté dochází opět ke kolísání hodnot a nárůstu hodnot TAG až na úroveň roku 2013.

Tabulka 7: Naměřené hodnoty

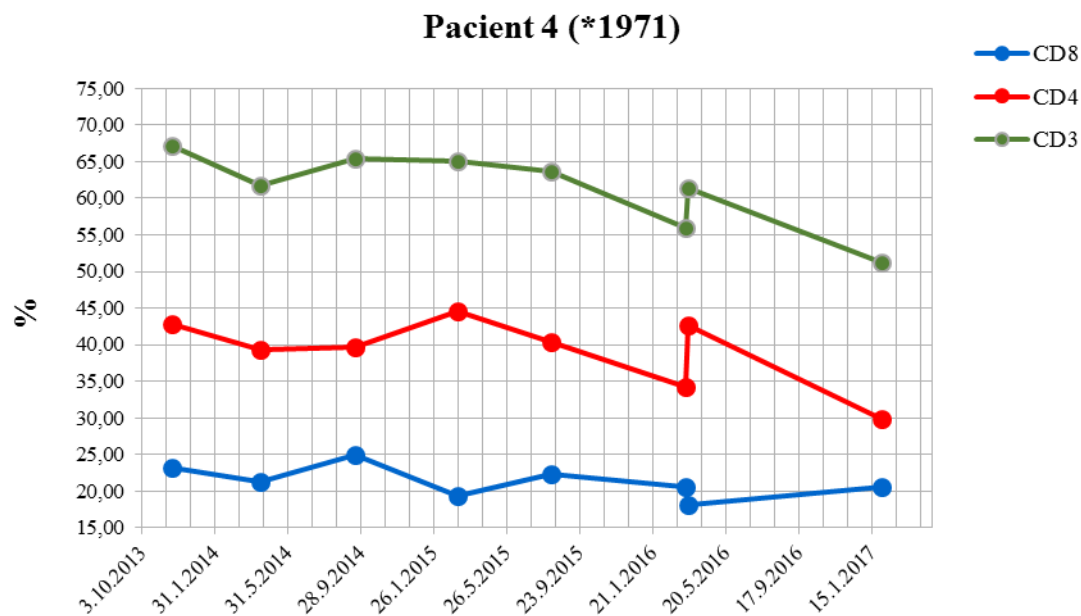
Pacient 3	Laktát [mmol/l]	Chol [mmol/l]	TAG [mmol/l]	HDL[mmol/l]
21. 11. 2013	2,60	4,84	2,90	0,84
22. 05. 2014	2,47	4,53	2,40	0,81
10. 11. 2014	2,31	4,42	2,08	0,69
18. 05. 2015	2,04	4,36	2,23	0,84
03. 11. 2015	1,95	4,07	1,71	0,75
23. 05. 2016	2,10	4,35	2,43	0,83
07. 11. 2016	1,97	4,27	1,73	0,77
10. 04. 2017	2,13	4,68	2,91	0,84
Pacient 3	CD8 [%]	CD4 [%]	CD3 [%]	
21. 11. 2013	40,43	33,14	81,32	
22. 05. 2014	41,73	37,29	85,65	
10. 11. 2014	44,20	33,69	85,56	
18. 05. 2015	40,97	34,32	83,16	
03. 11. 2015	43,43	32,17	83,07	
23. 05. 2016	41,37	35,94	84,25	
07. 11. 2016	41,71	33,64	82,65	
10. 04. 2017	42,74	31,40	82,81	



Graf 7: Vybrané biochemické markery



Graf 8: Jednotlivé subpopulace T-lymocyťů



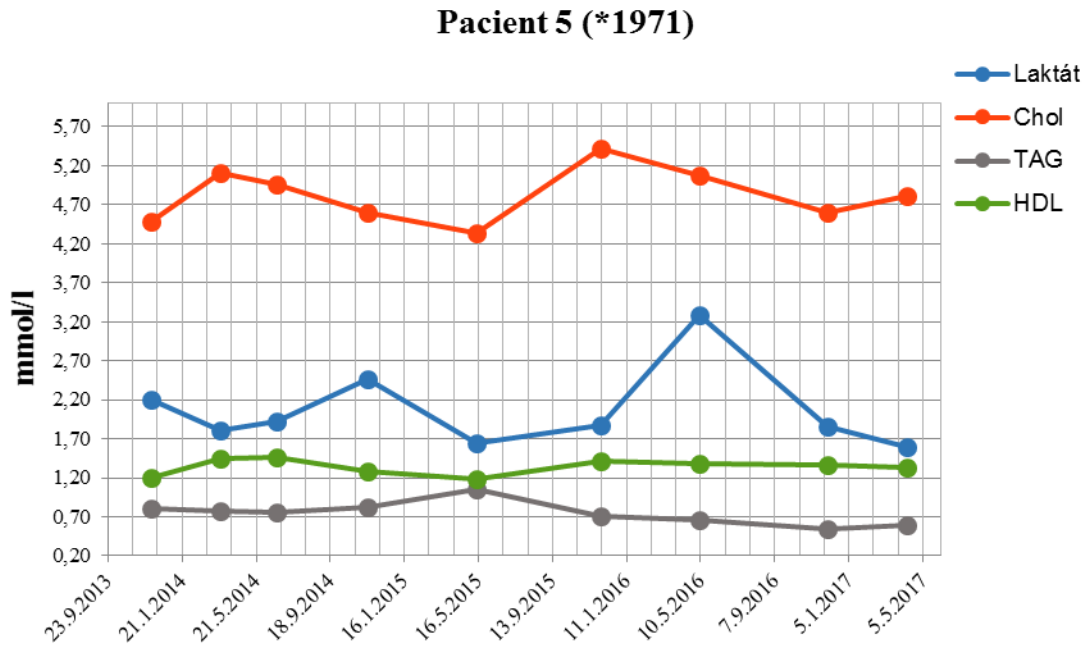
### Graf 7, 8: Pacient 4 (\*1971)

Pacient HIV typu A3 je léčen léky inhibující HIV proteázu a léky kombinující nukleosidové a nukleotidové inhibitory reverzní transkriptázy. Z grafu je patrný výrazný pokles TAG až na fyziologické hodnoty na přelomu roku 2013 – 2014 na fyziologických hodnotách se drží až do roku 2017, současně dochází nejprve k nárůstu celkového cholesterolu ze 4,5 mmol/l až na 5,7 mmol/l a poté k opětovnému poklesu na hodnotu 4,5 mmol/l při posledním měření v únoru 2017. Laktát a HDL se pohybují ve fyziologickém rozmezí, poslední měření ukázalo výrazný nárůst laktátu a TAG a současně pokles HDL. Na druhém grafu je vidět významný pokles CD3+ a CD4 subpopulace T-lymfocytů a mírný vzestup CD8+ lymfocytů.

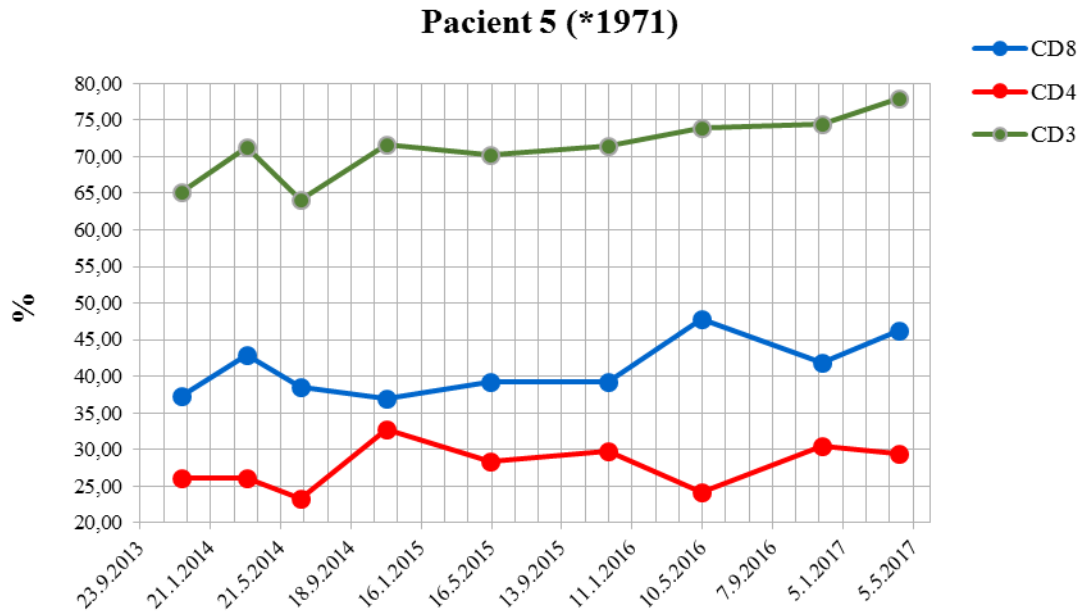
Tabulka 8: Naměřené hodnoty

Pacient 4	Laktát [mmol/l]	Chol [mmol/l]	TAG [mmol/l]	HDL [mmol/l]
21. 11. 2013	1,42	4,49	3,69	1,14
14. 04. 2014	0,82	4,25	1,20	1,10
17. 09. 2014	1,59	4,93	1,75	1,22
05. 03. 2015	1,26	5,70	1,03	1,16
06. 08. 2015	0,85	5,55	1,43	1,28
15. 03. 2016	1,05	4,75	1,07	1,35
19. 03. 2016	1,78	4,07	1,27	1,21
01. 02. 2017	3,72	4,54	2,45	1,04
Pacient 4	CD8 [%]	CD4 [%]	CD3 [%]	
21. 11. 2013	23,28	42,78	67,23	
14. 04. 2014	21,27	39,31	61,76	
17. 09. 2014	24,92	39,65	65,33	
05. 03. 2015	19,29	44,62	65,02	
06. 08. 2015	22,25	40,34	63,74	
15. 03. 2016	20,53	34,25	56,00	
19. 03. 2016	18,03	42,59	61,36	
01. 02. 2017	20,53	29,80	51,28	

Graf 9: Vybrané biochemické markery



Graf 10: Jednotlivé subpopulace T-lymocyťů



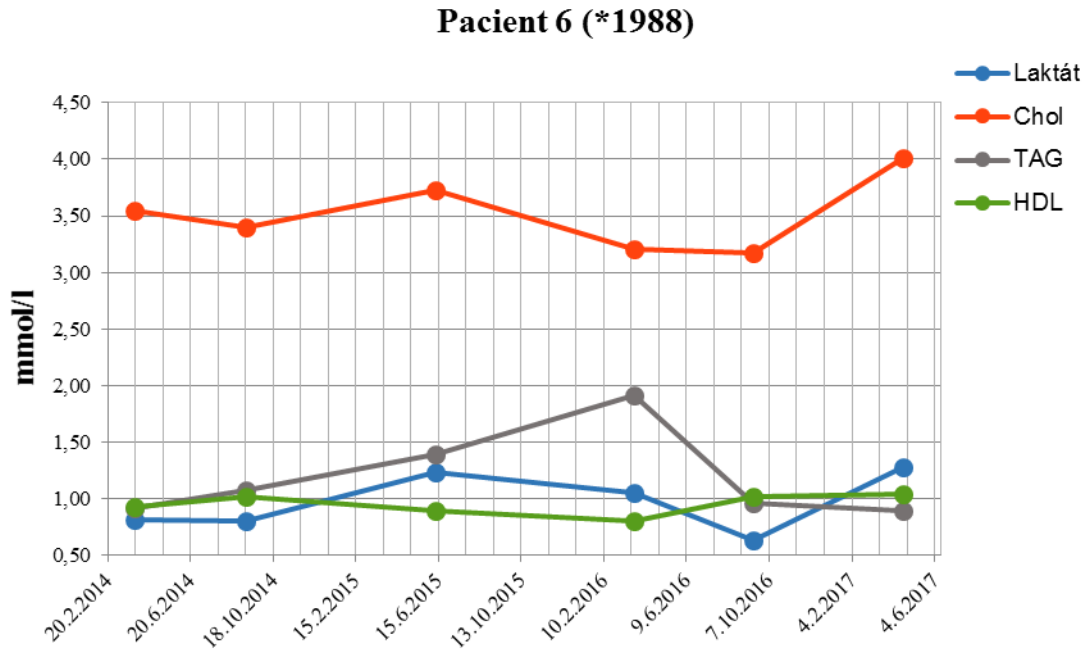
### Graf 9, 10: Pacient 5 (\*1971)

Pacient léčen od roku 2007 z HIV typu C3 a CD4+ subpopulací pod  $90 \times 10^6$  buněk. Na prvním grafu je patrný periodický nárůst a pokles celkového cholesterolu a laktátu. Hodnoty TAG a HDL se pohybují po celou dobu ve svém fyziologickém rozmezí. U subpopulací CD4 CD8 je patrný vzájemný reciprokový průběh, při poklesu CD8 dochází k nárůstu CD4 a naopak. Celkově dochází k nárůstu počtu T-lymfocytů na základě postupného mírného zvyšování CD8+ buněk.

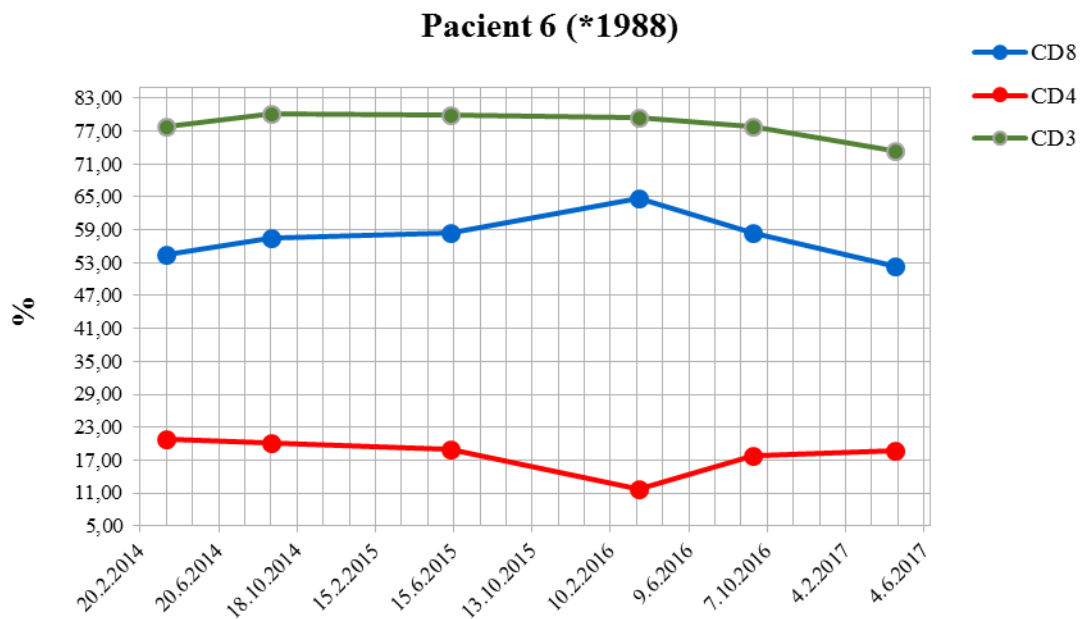
Tabulka 9: Naměřené hodnoty

Pacient 5	Laktát [mmol/l]	Chol [mmol/l]	TAG [mmol/l]	HDL [mmol/l]
02. 12. 2013	2,20	4,49	0,81	1,20
24. 03. 2014	1,80	5,11	0,77	1,45
23. 06. 2014	1,92	4,96	0,75	1,47
18. 11. 2014	2,46	4,60	0,83	1,29
13. 05. 2015	1,64	4,33	1,06	1,18
30. 11. 2015	1,87	5,42	0,70	1,42
09. 05. 2016	3,28	5,08	0,66	1,38
01. 12. 2016	1,86	4,60	0,55	1,37
10. 04. 2017	1,60	4,82	0,59	1,33
Pacient 5	CD8 [%]	CD4 [%]	CD3 [%]	
02. 12. 2013	37,27	26,11	65,22	
24. 03. 2014	42,92	26,02	71,236	
23. 06. 2014	38,53	23,36	64,14	
18. 11. 2014	36,93	32,79	71,71	
13. 05. 2015	39,23	28,45	70,28	
30. 11. 2015	39,18	29,77	71,5	
09. 05. 2016	47,76	24,17	73,96	
01. 12. 2016	41,8	30,54	74,51	
10. 04. 2017	46,29	29,44	77,97	

Graf 11: Vybrané biochemické markery



Graf 12: Jednotlivé subpopulace T-lymocyti



### Graf 11, 12: Pacient 6 (\*1988)

Pacient od roku 2009 s HIV A1 bez antivirové léčby, léčba zahájena v roce 2016 při zjištěné HIV A2 s imunologickou a virovou progresí. Na grafu je vidět konstantní vzestup TAG, mimo fyziologické rozmezí do zahájení antivirové léčby v dubnu 2016. Poté je zaznamenán výrazný pokles TAG až do posledního měření v dubnu 2017. Při zahájení léčby došlo k poklesu koncentrace laktátu, který ovšem začal stoupat. V období zahájení léčby došlo ke změně trendu HDL po dlouhodobém mírném konstantním poklesu začal mírně stoupat. S několika měsíčním zpožděním došlo i k nárůstu celkového cholesterolu. V období před zahájením antiretrovirové léčby je patrný pozvolný pokles CD4+ lymfocytů a současně nárůst CD8+ lymfocytů. Po zahájení léčby dochází k nárůstu CD4+ a poklesu CD8+ lymfocytů. )

Tabulka 10: Naměřené hodnoty

Pacient 6	Laktát [mmol/l]	Chol [mmol/l]	TAG [mmol/l]	HDL [mmol/l]
31. 03. 2014	0,82	3,55	0,92	0,93
09. 09. 2014	0,80	3,40	1,08	1,02
10. 06. 2015	1,24	3,73	1,39	0,90
24. 03. 2016	1,05	3,21	1,91	0,80
14. 09. 2016	0,64	3,17	0,96	1,02
20. 04. 2017	1,28	4,01	0,89	1,04
Pacient 6	CD8 [%]	CD4 [%]	CD3 [%]	
31. 03. 2014	54,44	20,76	77,79	
09. 09. 2014	57,40	20,20	80,26	
10. 06. 2015	58,38	18,91	79,93	
24. 03. 2016	64,80	11,80	79,52	
14. 09. 2016	58,42	17,73	77,83	
20. 04. 2017	52,36	18,84	73,39	

## 12. Diskuze:

Onemocnění HIV se řadí mezi chronické infekce, při němž virus infikuje zejména buňky imunitního systému, převážně T-lymfocyty, což vede k postupnému poklesu schopnosti imunitního systému hostitel úspěšně čelit běžným infekcím, či infekcím spojenými s nádorovým bujením. Tento stav vede k rozvoji tzv. syndromu získané imunitní nedostatečnosti (AIDS). (Staňková 2002).

K léčbě HIV je v dnešní době využívána řada antiretrovirotik, jejichž podávání vede k poklesu replikace a tedy množení a šíření viru v buňkách hostitele. Podávání v současné době dostupných antiretrovirotik je však spojeno s celou řadou nežádoucích účinků, jež mohou vést k výraznému poškození organismu a které se obvykle projevují vychýlením hodnot některých látek enzymů a metabolitů v krvi mimo fyziologické rozmezí.

Vhodné vybalancování terapeutického efektu a nežádoucích účinků podávaných antiretrovirotik je důležitým předpokladem vhodné a účinné léčby.

Hodnocení účinku terapie je tedy prováděno ze dvou úhlů pohledu.

1. sledování nežádoucích účinků
2. sledování efektivity léčby

Hodnocení nežádoucích účinků:

Pro hodnocení nežádoucích účinků antiretrovirové léčby je využívána celá paleta běžných biochemických markerů, pro potřeby této práce byly použity jen některé z nich. Vzhledem k tomu, že se jedná o základní biochemická vyšetření prováděná běžně v klinických laboratořích, bývají k jejich provedení používány automatické analytické systémy (např. Architect *ci8200*) pracující na principu spektrofotometrie s použitím komerčně dodávaných validovaných souprav reagensí, pracovních roztoků a spotřebního materiálu (SOP technický, 2015). Pro minimalizaci získávání nesprávných výsledků je v tomto případě nezbytné postupovat dle pokynů výrobce při přípravě analyzátoru, jeho údržbě a kalibracích jednotlivých metod a dále postupovat dle principů správné laboratorní práce, zejména při hodnocení vnitřní

kontroly kvality (využití Westgardových pravidel), správný postup v preanalytické fázi (správný postup odběru vzorku, vhodný odběrový systém, podmínky transportu, atd.)

Hodnocení efektivity léčby:

Pro hodnocení účinnosti léčby je využíváno zejména sledování stavu imunitního systému a replikační aktivita viru. Stav imunitního systému je hodnocen pomocí měření zastoupení jednotlivých subpopulací T-lymfocytů, zatímco replikační aktivita viru je hodnocena počtem kopií virové RNA. Tato práce se zabývala imunofenotypizací subpopulací T-lymfocytů pomocí průtokové cytometrie prováděné na OKBI Nemocnice Na Bulovce. Výsledkem byly absolutní i relativní počty jednotlivých subpopulací lymfocytů a jejich vzájemné poměry v závislosti na tíži infekčního onemocnění.

Jako důkaz využití biochemických markerů a imunofenotypizace při hodnocení efektu terapie bylo vybráno 6 HIV pozitivních pacientů, kteří pravidelně dochází do AIDS centra, které je součástí Kliniky infekčních, parazitárních a tropických nemocí Nemocnice Na Bulovce, jsou podrobeni antiretrovirové léčbě a jsou u nich pravidelně sledovány účinky léčby jak z hlediska nežádoucích účinků, tak i efektivity terapie. V rámci této práce byla u těchto pacientů zpětně sbírána data získaná v průběhu 3-4 let a hodnoceny časové změny vybraných parametrů ve sledovaném období i jejich vzájemná korelace a jejich případná korelace v závislosti na úspěšnosti či neúspěšnosti léčby. Pro přehlednost jsou informace prezentovány pomocí vývojových grafů jednotlivých parametrů.

Na grafech znázorňujících stav T-lymfocytů je vidět u většiny případů korelace mezi subpopulacemi CD4+ a CD3+, tedy celkovou populací T-lymfocytů. Výjimku zde tvoří pacienti č. 2 a 6. U nich kopíruje celkový počet T-lymfocytů spíše křivku CD8+. U pacienta č. 2 došlo podle lékařských záznamů v roce 2016 ke změně léčby, což může souviset s významným nárůstem počtu CD8+ lymfocytů při posledním měření. U všech pacientů z výběru je ovšem patrný vzájemný opačný trend vývoje počtu buněk CD4+ a CD8+. V případě nárůstu počtu CD4+ vždy dochází k poklesu CD8+ a naopak.



U biochemických markerů, tedy markerů nežádoucích účinků léčby jsou vidět časové křivky s poměrně rozmanitým průběhem. Často lze z grafů vypožorovat podobný průběh křivky celkového cholesterolu a TAG. Toto neplatí u pacientů č. 5 a 6. U pacienta č. 5 dochází k periodickému kolísání koncentrace celkového cholesterolu během sledovaného období, zatímco koncentrace TAG se drží téměř na konstantní úrovni ve fyziologickém rozmezí. Z toho lze usoudit, že podávaná léčba nemá zřejmě výrazný vliv na hladiny TAG u tohoto pacienta, teda aspoň během sledovaného období. Neméně zajímavá je křivka laktátu, jejichž průběh je u každého pacienta jiný. Vzhledem k tomu, že každý pacient je léčen jinými farmaky, lze usoudit, že tyto léky podstatně ovlivňují koncentrace laktátu. Zajímavý je také prudký nárůst koncentrace laktátu doprovázeného výrazným nárůstem TAG u pacienta č. 4 se současným poklesem počtu CD3+ a CD4+ lymfocytů při posledním měření, což může souviset se změnou léčby, nebo může být příčinou i neukázněnost pacienta a nedodržení postupu léčby z jeho strany. Zajímavý bude další vývoj.

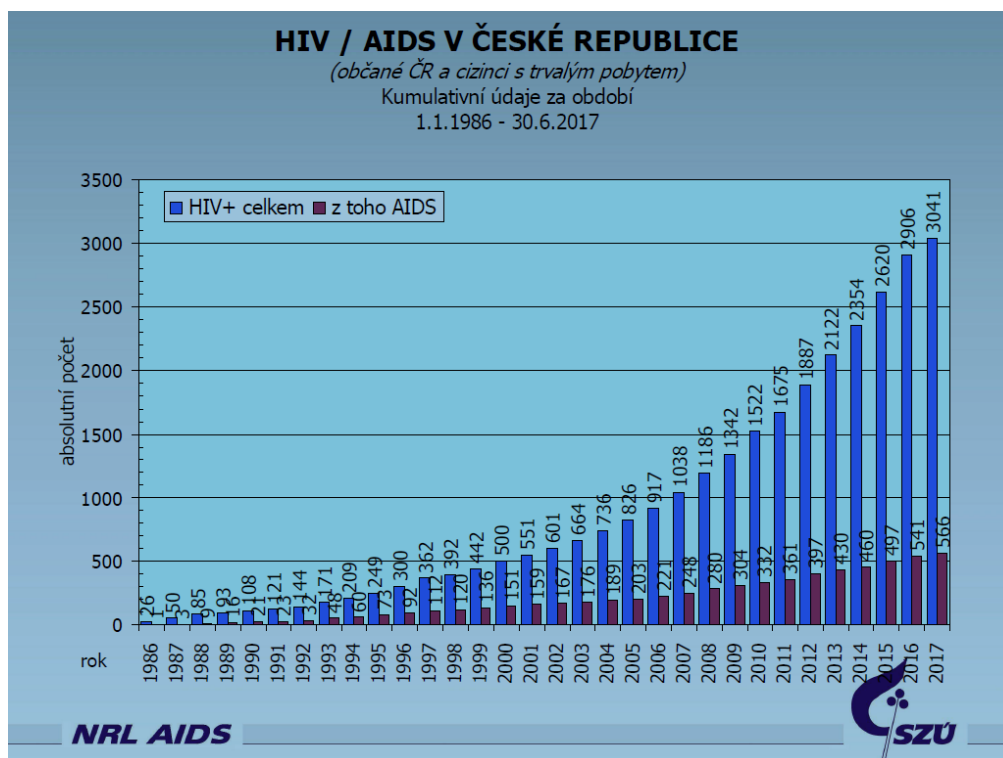
Vzhledem k množství farmak používaných při antiretrovirové léčbě a množství jejich kombinací je nezbytné sledovat během léčby její efektivitu a současně i vývoj nežádoucích účinků. Účinky, jak pozitivní tak i negativní, se v-při kombinaci antiretrovirotik také kombinují. Současně se projevují i odlišnosti v metabolismu xenobiotik jednotlivých pacientů, jejich aktuální zdravotní a fyzický stav, věk, jiné choroby a další aspekty, které mohou výrazně ovlivnit účinky podávaných léků. Proto je nezbytné v pravidelných intervalech sledovat jednotlivé markery vyhodnocovat efektivitu léčby a případně měnit kombinaci a dávkování léků. Léčba pacientů s HIV je velice individuální, protože odpověď těchto pacientů na podávanou léčbu je také individuální a vysoce specifická, jak je vidět na hodnotách markerů i u malého souboru pacientů vybraných pro tuto práci.

### 13. Závěr

Syndrom získaného imunodeficitu (AIDS) byl jako nová klinická jednotka rozpoznán v roce 1981 a v roce 1983 byl identifikován jeho původce, nový lidský retrovirus. O tři roky později byl Mezinárodní komisí pro nomenklaturu označen jako virus lidského imunodeficitu (HIV). Během následujících desetiletí přerostla nákaza v pandemii celosvětového rozsahu (Dyslipidemie indukovaná antiretrovirovými léčivými, (Snopková S., et. al.) Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) v roce 2016 bylo na světě 36,7 milionů nakažených HIV, přičemž incidence onemocnění se výrazně liší v závislosti na regionu. Nejpostiženějším místem na světě je subsaharská Afrika, kde připadá téměř jeden nakažený HIV na 25 obyvatel (4,2 %) a odhaduje se, že na tento region připadají dvě třetiny všech lidí žijících s HIV. Podle WHO pak v loňském roce zemřelo na světě v souvislosti s HIV asi 1 milion lidí

Na Evropu podle WHO připadalo v roce 2016 asi 2,4 milionu nakažených HIV, což odpovídá přibližně 6,5 % nakažené populace. Podle statistik Státního zdravotního ústavu (SZÚ) bylo ke dni 30. 6. 2017 v ČR zjištěno 3041 případů nakažených HIV, z nichž 2900 (85,8 %) tvoří muži. Z těchto 3466 případů HIV pozitivních je celkem 566 v klinickém stádiu AIDS. Nejvíce HIV pozitivních v ČR hlásí Praha a to jak v absolutních počtech (1483 případů), tak i relativních (1194 na 100 000 obyvatel)

Graf 13: Nárůst počtu nakažených HIV a nemocných AIDS na území České republiky



Zdroj: SZÚ

V roce 1981, v době, kdy bylo onemocnění AIDS objeveno, se pacienti dožívali v průměru 6 měsíců od stanovení diagnózy. V roce 1987, kdy byl do praxe uveden první lék (u nás o rok později) se se nakaženým prodloužil život asi o rok. Zlom v terapii přišel v devadesátých letech nástupem kombinované antiretrovirové terapie při níž se podávají obvykle současně tři léky, z nichž jedním je Tanofovir, molekula objevená profesorem Antonínem Holým, která je dnes nejužívanějším lékem na HIV.

Současná antiretrovirová terapie si klade dva zásadní cíle. Zaprvé individuální, kdy zamezením replikace viru docílíme normalizace stavu imunitního systému a prodloužíme život pacienta. Druhým cílem léčby je epidemiologický, čili snížení rizika šíření viru populací. Je známo, že u dobře léčených pacientů je asi 1000x nižší pravděpodobnost přenosu viru sexuální cestou a 10x nižší pravděpodobnost přenosu z matky na plod než u pacientů neléčených.

V současné době je v ČR k dispozici 24 přípravků používaných k léčbě HIV. Vedle celé řady nežádoucích účinků je velkým problémem také častá rezistence. Podle prof.

Machaly z AIDS centra Nemocnice Na Bulovce je 98 % vzniku rezistencí způsobeno samotnými pacienty. Současná léčiva jsou užívána obvykle jednou nebo dvakrát denně, a vždy ve stejnou dobu (plus minus 20 minut). I zdánlivě malý výpadek nebo vynechání léčby může nastartovat další proces množení a mutaci viru, což vede ke vzniku dalších rezistencí. Dalším problémem léčby HIV bývá i vysoká cena. Ta se pohybuje mezi 300 až 350 tisíci Kč ročně a je třeba ji užívat doživotně.

Vedle léků užívaných k terapii HIV nemocných jsou k dispozici i léky sloužící k postexpoziční profylaxi, která je využívána například u zdravotníků, kteří se poraní o jehlu použitou HIV pozitivním pacientem, nebo u lidí, kteří měli pohlavní styk s HIV pozitivním. Tato léčba se doporučuje užívat po dobu čtyř týdnů, čímž dojde k výraznému snížení rizika přenosu. Existuje také preexpoziční profylaxe pro lidi s častým sexuálním stykem s neznámými partnery.

Asi 25 % pacientů na území ČR je podle odhadů bez diagnózy. Tento fakt je dán z části sociálním postavením těchto lidí a pak také obavou některých lidí navštívit lékaře a svěřit se se svým problémem.

Včasné stanovení diagnózy HIV je klíčový krok pro léčbu onemocnění. V této fázi hraje laboratorní diagnostika nezastupitelnou roli. Vyšetření krve pacienta na přítomnost protilátek proti HIV a přítomnost antigenu p24 probíhá ve většině laboratoří za použití imunochemických metod, jakou je například metoda CMIA na analyzátoru Architect *i2000*. V případě reaktivity je nutné případnou pozitivitu prokázat dalšími nezávislými metodami. Toto potvrzení provádí pro ČR Národní referenční laboratoř pro AIDS při SZÚ v Praze. Doba od okamžiku nákazy do stanovení diagnózy je u nás v průměru asi tři roky, přičemž doba od nakažení do počátku stádia AIDS bývá okolo osmi let.

Úkolem laboratorní diagnostiky po stanovení diagnózy je společně s lékařem sledovat účinky podávané antiretrovirové terapie z hlediska účinku terapeutického, tedy sledovat průběžně stav imunitního systému pacienta prostřednictvím zjišťování počtu vybraných imunokompetentních buněk, konkrétně subpopulací T-lymfocytů, a včas reagovat na případné negativní trendy ve změně počtu těchto buněk a pak také monitorovat nežádoucí účinky léčby, které jsou významným limitem antiretrovirové

léčby a jež mohou být i velmi závažné. Ke sledování těchto nežádoucích účinků jsou využívány běžné biochemické markery metabolismu, orgánově specifické funkční testy, krevní obraz a vyšetření moče.

Pacienti AIDS centra Nemocnice Na Bulovce jsou průběžně monitorováni formou pravidelných návštěv na ambulancích, v průměru každé tři měsíce, přičemž každých šest měsíců je u nich provedeno kompletní laboratorní vyšetření za účelem popsaným výše. Po zhodnocení výsledky laboratorních testů, aktuálního klinického stavu pacienta a dalších aspektů rozhodne lékař o pokračování nebo úpravě léčebného postupu.

Terapie HIV je stejně jako u řady jiných vážných onemocnění komplexní záležitostí. Pacienti vedle samotné antiretrovirové terapie mají možnost využívat další péči, zejména psychologickou, sociální a další. V dnešní době se pacienti při správně vedené léčbě mohou dožít stejného věku jako průměrná populace. Pokrok při vývoji léků proti HIV má však i negativní rysy, jedním z nich je absence strachu z choroby, podceňování rizikových faktorů a obecně rizikovější chování některých lidí. Lék, který by definitivně eliminoval virus v těle, však stále objeven nebyl a podle prof. Machaly je jeho objev stále v nedohlednu.

## 14. Použitá literatura

1. AMBROŽOVÁ, Helena, et al. 2012. *Diferenciálně diagnostické kapitoly z infekčního lékařství*. 2., upr. vyd. Praha: Karolinum. 125 s. ISBN 9788024620404.
2. BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK, et al. 2011. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada. 164 s. ISBN 9788024735337.
3. BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Anna ŠEDIVÁ. 2002. *Imunologie: minimum pro praxi*. Vyd. 3. Praha: Triton. 95 s. Levou zadní. ISBN 8072542052.
4. FEDERICO, Maurizio. 2003. *Lentivirus gene engineering protocols*. Totowa, N. J.: Humana Press. *Methods in molecular biology* (Clifton, N. J.), v. 229. 328 s. ISBN 1588290913.
5. GÖPFERTO VÁ, Dana, Petr PAZDIORA a Jana DÁŇOVÁ. 2013. *Epidemiologie: obecná a speciální epidemiologie infekčních nemocí*. 2., přeprac. vyd. Praha: Karolinum. 224 s. ISBN 9788024622231.
6. HÁJEK, Marcel. 2004. *HIV/AIDS v chirurgických oborech*. Praha: Grada, 2004. Malá monografie (Grada). 88 s. ISBN 8024708574.
7. HOBSTOVÁ, Jiřina, Helena AMBROŽOVÁ, et al. 2012. *Infectious diseases*. 2nd rev. ed. Prague: Karolinum. 248 s. ISBN 9788024621111.
8. JÍLEK, Petr. *Imunologie: stručně, jasně, přehledně*. Praha: Grada, 2014. 96 s. ISBN 9788024748221.
9. JILICH, David a Veronika KULÍŘOVÁ. *HIV infekce: současné trendy v diagnostice, léčbě a ošetrovatelství*. Praha: Mladá fronta, 2014. Aeskulap. 176 s. ISBN 9788020433251.
10. KAZDA, Antonín. *Kritické stavy: metabolická a laboratorní problematika*. Praha: Galén, 2012. 346 s. ISBN 9788072627639.
11. KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 2007. 218 s. ISBN 9788070134504.
12. KONVALINKA, Jan a Ladislav MACHALA. *Viry pro 21. století*. Praha: Academia, 2011. Průhledy (Academia). 144 s. ISBN 9788020020215.

13. KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. 498 s. ISBN 9788024729770.
14. NEDOVIĆ, Viktor a Ronnie. WILLAERT. *Applications of cell immobilisation biotechnology*. Dordrecht: Springer, 2005. 567 s. ISBN 1402032293.
15. OTOVÁ, Berta a Romana MIHALOVÁ. *Základy biologie a genetiky člověka*. V Praze: Karolinum, 2012. 228 s. ISBN 9788024621098.
16. ROZSYPAL, Hanuš. *AIDS: klinický obraz a léčba*. Praha: Maxdorf, c1998. 236 s. ISBN 8085800926.
17. SEDLÁČEK, Petr. *Jak se vyznat v laboratorních hodnotách: jak správně rozumět laboratorním výsledkům? : jaké jsou normální hodnoty? : co znamenají odchylky?*. Praha: Eminent, 2006. 148 s. ISBN 8072812564.
18. STAŇKOVÁ, Marie, Vilma MAREŠOVÁ a Jiří VANIŠTA. *Repetitorium infekčních nemocí*. Praha: Triton, 2008. 208 s. ISBN 9788073870560.
19. STAŇKOVÁ, Marie, Vilma MAREŠOVÁ a Jiří VANIŠTA. *Infekční lékařství: minimum pro praxi*. 2. vyd. Praha: Triton, 2002. Levou zadní. 220 s. ISBN 8072542362.
20. STITES, Daniel P. a Abba I. TERR. *Základní a klinická imunologie*. Praha: Victoria Publishing, 1994. 744 s. ISBN 8085605376.
21. THOMAS, Lothar, ed. *Clinical laboratory diagnostics: use and assessment of clinical laboratory results*. Frankfurt/Main: TH-Books, 1998. 1527 s. ISBN 3980521540.
22. TROJAN, Stanislav a Miloš LANGMEIER. *Slovníček lékařské fyziologie*. 2., dopl. vyd. Praha: Galén, c2006. 141 s. ISBN 8072623753.
23. ZIMA, Tomáš. *Laboratorní diagnostika*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2007. 906 s. ISBN 9788072623723
24. Lactic Acid. Abbott Laboratories. Příbalová informace Leden 2016
25. HIV Ag/Ab Combo. Architect systém. Příbalová informace Květen 2014.

## Online literatura

1. [ONLINE]. Labguide.cz/metody/western-blot/ Copyright © 2014  
[cit. 2017-04-29]
2. ABBOTT ARCHITECT ci16200. SOP/SOP technický. OKBI\_SOPT\_018.  
Verze 02. 11. 11. 2016. [ONLINE].  
Dostupné z: \\ad.bulovka.cz\sdilene\složky\komplement\Centrální  
laboratoře\Html dokumentace\Dokumentace OKBI\HVEZDA2ADP.htm.  
[cit. 2017-03-25].
3. Abbott Architect i2000SR. SOP/SOP technický. OKBI\_SOPT\_029. Verze 01.  
11. 11. 2016. [ONLINE].  
Dostupné z: \\ad.bulovka.cz\sdilene\složky\komplement\Centrální  
laboratoře\Html dokumentace\Dokumentace OKBI\HVEZDA1AMO.htm  
[cit. 2017-03-25].
4. Brůčková M. 2009. *Zprávy epidemiologie a mikrobiologie: Nobelova cena za rok 2008*. 71-72 s. [ONLINE]. Praha: SZÚ.  
Dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/zpravy-epidemiologie-a-mikrobiologie/zpravy-em-2-unor-2009> [cit. 2017-01-03].
5. Brůčková M. 2011;20(12). *Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie: 30 let od popsání prvních případů AIDS: historie a současnost I. část* 435-438 s. [ONLINE]. Praha: SZÚ. Dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/zpravy-epidemiologie-a-mikrobiologie/zpravy-cem-12-prosinec-2011?highlightWords=zpr%C3%A1vy+cem> [cit. 2017-01-03].
6. Brůčková M. 2017. Měsíční výkazy o výskytu HIV/AIDS v České republice a tiskové zprávy Národní referenční laboratoře pro HIV/AIDS. *Měsíční výkazy červen 2017: Výskyt a šíření HIV/AIDS v České republice*. 1-13 s. [ONLINE]. Praha: SZÚ. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/zprava-o-vyskytu-a-sireni-hiv-aids-za-rok-2017> [cit. 2017-08-08].



7. článek z 004.cz Autor: -prh-. 02. 06. 2016. *Prevence HIV-AIDS: Léčba infekce HIV*. [ONLINE]. Dostupné z: [www.004.cz/lecba-infekce-hiv](http://www.004.cz/lecba-infekce-hiv). © 2001-2017 Code004/ ISSN 1214-4452. [cit. 2017-05-06]
8. Friedecký, Kratochvíla. 9. 8. 2004. *Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi*. [ONLINE].  
Dostupné z: <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/A/AJDKT.htm>.  
[cit. 2017-08-08]
9. HDL cholesterol (ARCHITECT). SOP/SOP pro laboratorní vyšetření. OKBI\_SOPV\_056. Verze 02. 11. 11. 2016. [ONLINE].  
Dostupné z: \\ad.bulovka.cz\sdilene\složky\komplement\Centrální laboratoře\Html dokumentace\Dokumentace OKBI\HVEZDA2ADW.htm  
[cit. 2017-03-25].
10. HIV Ag/Ab Combo (CMIA, Abbott Architect). SOP/SOP pro laboratorní vyšetření. OKBI\_SOPV\_093. Verze 02. 11. 11. 2016. [ONLINE].  
Dostupné z: \\ad.bulovka.cz\sdilene\složky\komplement\Centrální laboratoře\Html dokumentace\Dokumentace OKBI\HVEZDA1AIE.htm  
[cit. 2017-03-25].
11. Cholesterol (ARCHITECT). SOP/SOP pro laboratorní vyšetření. OKBI\_SOPV\_057. Verze 02. 11. 11. 2016. [ONLINE].  
Dostupné z: \\ad.bulovka.cz\sdilene\složky\komplement\Centrální laboratoře\Html dokumentace\Dokumentace OKBI\HVEZDA2ADX.htm  
[cit. 2017-03-25].
12. Konvalinka, Machala. Vesmír 80. 6/2001. *Terapie aidsu po dvaceti letech*. [ONLINE]. Dostupné z: <http://casopis.vesmir.cz/clanek/terapie-aidsu-po-dvaceti-letech>. [cit. 2017-03-24].

13. Koubová M. 2016. Jak bojovat s HIV? Jedna věc je účinná léčba, druhá zodpovědnost pacientů a rizikových skupin. [ONLINE].  
Dostupné z: <http://www.zdravotnickydenik.cz/2017/08/bojovat-hiv-jedna-vec-ucinna-lecba-druha-zodpovednost-pacientu-rizikovych-skupin/>  
[cit. 2017-08-09].
14. *Laboratorní příručka. Oddělení klinické biochemie a imunologie Nemocnice Na Bulovce.* 2016-02-01. Verze 07. Cholesterol HDL v séru. [ONLINE].  
Dostupné z: [bulovka.cz/wp-content/oddeleni/okbi/laboratorni\\_prirucka/\\_LP\\_02036-L0000001.htm](http://bulovka.cz/wp-content/oddeleni/okbi/laboratorni_prirucka/_LP_02036-L0000001.htm) [cit. 2017-03-25]
15. *Laboratorní příručka. Oddělení klinické biochemie a imunologie Nemocnice Na Bulovce.* 2016-02-01. Verze 07. Cholesterol LDL v séru. [ONLINE].  
Dostupné z: [bulovka.cz/wp-content/oddeleni/okbi/laboratorni\\_prirucka/\\_LP\\_02325-L0000001.htm](http://bulovka.cz/wp-content/oddeleni/okbi/laboratorni_prirucka/_LP_02325-L0000001.htm) [cit. 2017-03-25]
16. *Laboratorní příručka. Oddělení klinické biochemie a imunologie Nemocnice Na Bulovce.* 2016-02-01. Verze 07. Cholesterol v séru. [ONLINE].  
Dostupné z: [bulovka.cz/wp-content/oddeleni/okbi/laboratorni\\_prirucka/\\_LP\\_01350-L0000001.htm](http://bulovka.cz/wp-content/oddeleni/okbi/laboratorni_prirucka/_LP_01350-L0000001.htm) [cit. 2017-03-25]
17. *Laboratorní příručka. Oddělení klinické biochemie a imunologie Nemocnice Na Bulovce.* 2016-02-01. Verze 07. Laktát v plazmě. [ONLINE].  
Dostupné z: [bulovka.cz/wp-content/oddeleni/okbi/laboratorni\\_prirucka/\\_LP\\_02280-L0000001.htm](http://bulovka.cz/wp-content/oddeleni/okbi/laboratorni_prirucka/_LP_02280-L0000001.htm) [cit. 2017-03-25]
18. *Laboratorní příručka. Oddělení klinické biochemie a imunologie Nemocnice Na Bulovce.* 2016-02-01. Verze 07. Anti-HIV 1,2 v séru. [ONLINE].  
Dostupné z: [bulovka.cz/wp-content/oddeleni/okbi/laboratorni\\_prirucka/\\_LP\\_14828-L0000001.htm](http://bulovka.cz/wp-content/oddeleni/okbi/laboratorni_prirucka/_LP_14828-L0000001.htm) [cit. 2017-03-25]
19. *Laboratorní příručka. Oddělení klinické biochemie a imunologie Nemocnice Na Bulovce.* 2016-02-01. Verze 07. Triacylglyceroly v séru. [ONLINE].  
Dostupné z: [bulovka.cz/wp-content/oddeleni/okbi/laboratorni\\_prirucka/\\_LP\\_12374-L0000005.htm](http://bulovka.cz/wp-content/oddeleni/okbi/laboratorni_prirucka/_LP_12374-L0000005.htm) [cit. 2017-03-25]

20. *Laboratorní příručka. Oddělení klinické biochemie a imunologie Nemocnice Na Bulovce.* 2016-02-01. Verze 07. Buňky CD8+ Tc lymfocyty. [ONLINE].  
Dostupné z: [bulovka.cz/wp-content/oddeleni/okbi/laboratorni\\_prirucka/\\_LP\\_06878-L0000005.htm](http://bulovka.cz/wp-content/oddeleni/okbi/laboratorni_prirucka/_LP_06878-L0000005.htm) [cit. 2017-03-25]
21. *Laboratorní příručka. Oddělení klinické biochemie a imunologie Nemocnice Na Bulovce.* 2016-02-01. Verze 07. Buňky CD4+ Th lymfocyty. [ONLINE].  
Dostupné z: [bulovka.cz/wp-content/oddeleni/okbi/laboratorni\\_prirucka/\\_LP\\_06647-L0000005.htm](http://bulovka.cz/wp-content/oddeleni/okbi/laboratorni_prirucka/_LP_06647-L0000005.htm) [cit. 2017-03-25]
22. *Laboratorní příručka. Oddělení klinické biochemie a imunologie Nemocnice Na Bulovce.* 2016-02-01. Verze 07. Buňky CD3+. [ONLINE].  
Dostupné z: [bulovka.cz/wp-content/oddeleni/okbi/laboratorni\\_prirucka/\\_LP\\_06458-L0000005.htm](http://bulovka.cz/wp-content/oddeleni/okbi/laboratorni_prirucka/_LP_06458-L0000005.htm) [cit. 2017-03-25]
23. Medicabaze.cz. 2007. *Nákaza virem HIV.* [ONLINE].  
Dostupné z: [http://www.medicabaze.cz/index.php?sec=term\\_detail&termId=1599](http://www.medicabaze.cz/index.php?sec=term_detail&termId=1599) [cit. 2016-12-04].
24. National Institute of Allergy and Infection Diseases. 2017. *HIV/AIDS Treatment.* [ONLINE]. Dostupné z: <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/antiretroviral-drug-development>. [cit. 2017-03-24].
25. Nuno R. Faria, Andrew Rambaut, Marc A Suchar et al. 2014. 56-61 s. *Science: The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations.* Vydání: 6205. [ONLINE]. Dostupné z: [science.sciencemag.org/content/346/6205/56](http://science.sciencemag.org/content/346/6205/56) [cit. 2016-11-05].
26. Pešková K. *Laktát.* [ONLINE].  
Dostupné z: [ciselniky.data.mzcr.cz/cd/hypertext/KPACD/htm](http://ciselniky.data.mzcr.cz/cd/hypertext/KPACD/htm) [cit. 2017-04-02]
27. Průtokový cytometr BD FACS Canto II. SOP/SOP technický. OKBI\_SOPT\_031. Verze 01. 11. 11. 2016. [ONLINE].  
Dostupné z: [\\ad.bulovka.cz\sdilene\složky\komplement\Centrální laboratoře\Html dokumentace\Dokumentace OKBI\HVEZDA8AEC.htm](http://ad.bulovka.cz/sdilene/slozky/komplement/Centrální%20laboratoře/Html%20dokumentace/Dokumentace%20OKBI/HVEZDA8AEC.htm) [cit. 2017-03-25].

28. Rozsypal H., Staňková M, Sedláček D, Snopková S, Kapla J, Aster V, Machala L, Jilich D, Dlouhý P, Kolčáková J, Zjevíková A, Jerhotová Z, Olbrechtová L. 11-2012. *Doporučený postup péče o dospělé infikované HIV a postexpoziční profylaxe infekce HIV*. Verze: 1. [ONLINE].  
Dostupné z: [www.infekce.cz/DoportART10xx.htm](http://www.infekce.cz/DoportART10xx.htm) [cit. 2017-04-05]
29. Snopková S., et. Al. 2008. 169-177 s. Vnitřní lékařství. Článek: Vnitř Lék 2008; 54(2): Dyslipidemie indukovaná antiretrovirovými léčivými. [ONLINE].  
Dostupné z: <http://www.prolekare.cz/vnitri-lekarstvi-clanek/dyslipidemie-indukovana-antiretrovirovymi-lecivy-51558> [cit. 2017-08-08]
30. Staňková, Rozsypal. 2002. Doporučené postupy pro praktické lékaře. *HIV infekce - Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně*. 4-5 s. [ONLINE]. Dostupné z: [www.cls.cz/dokumenty2/os/t249.rtf](http://www.cls.cz/dokumenty2/os/t249.rtf) [cit. 2017-03-20]
31. ŠÍPEK, A. jr.: Genetika - Biologie; *Váš zdroj informací o genetice a biologii*. [ONLINE]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz> [cit. 2016-12-04].
32. Triacylglyceroly (ARCHITECT). SOP/SOP pro laboratorní vyšetření. OKBI\_SOPV\_067. Verze 02. 11. 11. 2016. [ONLINE].  
Dostupné z: [\\ad.bulovka.cz\sdilene\složky\komplement\Centrální laboratoře\Html dokumentace\Dokumentace OKBI\HVEZDA2AEE.htm](http://ad.bulovka.cz/sdilene/slozky/komplement/Centrální laboratoře/Html dokumentace/Dokumentace OKBI/HVEZDA2AEE.htm) [cit. 2017-03-25].
33. Věstník Ministerstva zdravotnictví České republiky. 2016. [ONLINE].  
Dostupné z: <http://www.mzcr.cz/Legislativa/Soubor.ashx?souborID=28818&typ=application/pdf&nazev=ZDRAVOTNICTVI%2010-16.pdf>. [cit. 2017-03-24].
34. Vít, Walter. *Metodický návod k řešení problematiky infekce HIV/AIDS v ČR*. 2-3 s. [ONLINE]. Věstník 10. 2016. MZCR. [cit. 2017-03-24].  
Dostupné z: [http://www.mzcr.cz/Legislativa/dokumenty/vestnik-c10/2016\\_13122\\_11.html](http://www.mzcr.cz/Legislativa/dokumenty/vestnik-c10/2016_13122_11.html)
35. WHO. Global Health Observatory (GHO) data: HIV/AIDS. [ONLINE].  
Dostupné z: (<http://www.who.int/gho/hiv/en/>) [cit. 2017-08-08]

36. WHO. *HIV/AIDS. Informační list*.11-2016.  
Dostupné z: [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/). [ONLINE]  
[cit. 2017-03-25]
37. [www.cdc.gov/hiv/basics/whatishiv.html](http://www.cdc.gov/hiv/basics/whatishiv.html) [ONLINE] [cit. 2017-03-25]
38. [www.hiv-komunita.cz/uvod-do-lecby.html](http://www.hiv-komunita.cz/uvod-do-lecby.html) [ONLINE] [cit. 2017-02-19]
39. *Zákon č. 258/2000 Sb. o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů*. Díl 4. dle odstavce § 71. [ONLINE] © Copyright Topinfo s.r.o. 2001-2017. ISSN 1801-4399. Dostupné z: <http://www.tzb-info.cz/pravni-predpisy/zakon-c-258-2000-sb-o-ochrane-verejneho-zdravi-a-o-zmene-nekterych-souvisejicich-zakonu>. [cit. 2017-04-23]
40. Zákoucká. 2008. *Národní referenční pro HIV/AIDS*. [ONLINE].  
Dostupné z: <http://www.szu.cz/narodni-referencni-laborator-pro-aids>.  
[cit. 2017-4-28].

Obrázek 1: Schématický obrázek viru. [ONLINE]. Dostupné z: <http://viry-bakterie.wz.cz/viry.htm>. [cit 2017-6-8]

Obrázek 2: Postup provedení metody Western blot. [ONLINE].  
Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/western-blot/>. [cit. 2017-04-29]

Obrázek 3: Chemický vzorec laktátu. [ONLINE].  
Dostupné z: [\\ad.bulovka.cz\sdilene\složky\komplement\Centrální laboratoře\Html dokumentace\Dokumentace OKBI\HVEZDA2ADZ.htm](http://ad.bulovka.cz/sdilene/slozky/komplement/Centrální%20laboratoře/Html%20dokumentace/Dokumentace%20OKBI/HVEZDA2ADZ.htm) [cit. 2017-03-25]

Obrázek 4: Chemický vzorec celkového cholesterolu. [ONLINE].  
Dostupné z: [\\ad.bulovka.cz\sdilene\složky\komplement\Centrální laboratoře\Html dokumentace\Dokumentace OKBI\HVEZDA2ADX.htm](http://ad.bulovka.cz/sdilene/slozky/komplement/Centrální%20laboratoře/Html%20dokumentace/Dokumentace%20OKBI/HVEZDA2ADX.htm) [cit. 2017-03-25]

## 15. Seznam zkratk

Ab	protilátka
Ag	antigen
AIDS	syndrom získané imunodeficiencie (Acquired Immune Deficiency Syndrome)
AMK	aminokyselina
APC	antigen prezentující buňky (Antigen-Presenting Cells)
BAL	bronchoalveolární laváž
BCR	B-buněčný receptor (B-Cell Receptor)
CCR5	C-C chemokinový receptor typu 5
CD	diferenciální antigen (Cluster Of Differentiation)
CDC	středisko pro kontrolu a prevenci nemocí (Centers For Disease Control And Prevention)
CMIA	chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročásticích
CNS	centrální nervový systém
CRP	C-reaktivní protein
CXC	chemokinový receptor
CXCR4	C-X-C chemokinový receptor typu 4
ČSAV	Československá Akademie věd
ČSSR	Československá socialistická republika
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	dvouvláknová DNA (Double-Stranded DNA)

dsRNA	dvouvláknová RNA (Double-Stranded RNA)
EDTA	ethylendiaminotetraoctová kyselina
GIT	gastrointestinální trakt
gp	glykoprotein
GRID	Gay-Related Immune Deficiency
HDL	High Denzity Lipoprotein
HIV	virus lidské imunodeficiencie (Human Immunodeficiency Virus)
hn-RNA	heterogenní nukleární RNA
HLA	system antigenů hlavního histokompatibilního systému (Human Leukocyte Antigen)
HTLV	lidský T-lymfotropní virus (Human T-lymphotropic Virus)
Chol	cholesterol celkový
ICT	integrovaný ISE Chip (Integrated Chip Technology)
Ig	imunoglobulíny
IL	interleukin
INF $\gamma$	interferon $\gamma$
IS	imunitní systém
ISE	iontově selektivní elektroda
LAV	Lymphadenopathy Associated Virus
LDL	Low Denzity Lipoprotein
LIS	laboratorní informační systém

LOD	enzym laktát oxidáza
MALT	slizniční imunitní systém (Mucosa Associated Lymphoid Tissues)
MBL	manóza vázající lektin (Mannose Binding Lectin)
MIP	makrofágový zánětlivý protein (Macrophage Inflammatory Proteins)
mRNA	mediátorová RNA (Messenger RNA)
MZCR	Ministerstvo zdravotnictví České republiky
NK	přirozený zabijáci (Natural Killers)
NNRTIs	non-nukleosidový inhibitor reverzní transkriptázy
NRL	Národní referenční laboratoř
NRTIs	nukleosidový inhibitor reverzní transkriptázy
POD	enzym peroxidáza
pre-mRNA	prekurzorová mediátorová RNA
QC	kontrola kvality (Quality Control)
RANTES	druh chemokinů (Regulated Upon Activation Normal T-Cell Expressed And Presumably Secreted)
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
RT	reverzní transkriptáza
SDF-1	faktor-1 odvozený ze stromálních buněk (Stromal Cell-Derived Factor-1)
SI	syncytia indukující



SIV	virus opičí imunodeficiency (Simian Immunodeficiency Virus)
SLP	správný laboratorní postup
Sn-RNA	malá jaderná RNA (Small Nuclear RNA)
SOP	standardní operační postup
ssRNA	jednovláknová RNA (Single Stranded RNA)
ssDNA	jednovláknová DNA (Single Stranded DNA)
SZÚ	Státní zdravotnický ústav
TAG	triacylglycerol
TBC	tuberkulóza
Tc-lymfocyty	cytotoxické T-lymfocyty
TCR	T-buněčný receptor (T-Cell Receptor)
TGF- $\beta$	transformující růstový faktor (Transforming Growth Factor- $\beta$ )
Th-lymfocyty	pomocné T-lymfocyty
TMP	transmembránový protein
TNF	tumor nekrotizující faktor (Tumor Necrosis Factor)
T reg	regulační lymfocyty
tRNA	transferová RNA
USA	Spojené státy americké (United State Of America)
UV-VIS	ultrafialovo-viditelná spektroskopie

