

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

**Vyšetření infekčních markerů u dárců krve na Transfuzním oddělení
Nemocnice České Budějovice a.s.**

Bakalářská práce

Autor: Jana Píchová

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: PharmDr. Hana Staňková

Datum odevzdání: 3. 5. 2013

Abstrakt

Vyšetření infekčních markerů u dárců krve na Transfuzním oddělení Nemocnice České Budějovice a.s.

Tématem práce je vyšetření infekčních markerů u dárců krve. Dle zákonné normy se darovaná krev vyšetřuje na původce onemocnění AIDS, HBV, HCV a syfilis. I když riziko přenosu v posledních desetiletích kleslo, stále zůstávají hrozbou transfuzní medicíny. Bakteriální kontaminace je dokonce nejdéle známé riziko hemoterapie. Na Transfuzním oddělení Nemocnice České Budějovice a.s. se vzorky od dárců krve vyšetřují v laboratoři Analytiky dárců. V současné době se všechna vyšetření provádějí na jediném přístroji Abbott Architect. Před analyzátozem Architect se virologické markery vyšetřovaly na přístroji Abbott AxSYM a syfilis se vyšetřoval pomocí diagnostické soupravy od firmy Serodia, metodou TP-PA.

Cílem práce je porovnat stávající a předchozí vyšetřovací systémy. Popsat jednotlivé metodiky vyšetřování, spočítat počty reaktivních výsledků a porovnat výsledky jejich konfirmačních vyšetření. Zjistit četnost reaktivních a pozitivních výsledku u nových dárců, ověřit výsledky druhé konfirmace u kontrolních vzorků.

Práce informuje o základních kritériích pro výběr dárců krve, jednotlivých infekčních markerech, kde jsou zařazeny infekce, u nichž dochází k delší přítomnosti původců v krvi a prostřednictvím darované krve dochází k přenosu nákazy.

Dále jsou popsány principy metod analyzátoru AxSYM, Architect a diagnostické soupravy Serodia TP-PA. U analyzátoru AxSYM se jedná o enzymovou imunoanalýzu na mikročasticích. Serodia TP-PA slouží k průkazu protilátek proti *Treponema pallidum*. Test je založen na principu aglutinace senzibilizovaných částic v přítomnosti protilátek proti *Treponema pallidum* v dárcovské plazmě. Přístroj Architect pracuje na principu chemiluminiscence, je to detekční metoda pro měření a kvantifikaci analytu. Analyzátoři AxSYM i Architect udávají výsledky automaticky jako poměr hodnoty optické denzity vzorku a cut-off, každý výsledek doprovází i slovní vyhodnocení. Hladina cut-off je arbitrální k rozlišení negativního a pozitivního výsledku. Reaktivní výsledky jsou odeslány do Národní referenční laboratoře, kde jsou opakovaně vyšetřeny

screeningovou metodou a metodami pracujícími na odlišném principu než je vyšetření screeningové.

V období od 1. 1. 2011 až 31. 1. 2011 bylo na analyzátoru AxSYM vyšetřeno 17262 dárců krve na infekce HIV, HBsAg a HCV, stejný počet vyšetření byl proveden i metodou TPPA pro diagnostiku onemocnění syfilis. V období od 1. 2. 2012 do 31. 1. 2013 bylo na analyzátoru Architect vyšetřeno 18346 vzorků od dárců krve na infekce HIV, HBV, HCV a syfilis. Z celkového počtu vyšetření provedených analyzátozem AxSYM a diagnostickou soupravou TP-PA bylo za rok 2011 reaktivních 57 vzorků. S příchodem analyzátoru Architect se počty reaktivních vzorků zvýšily více než dvojnásobně na 121 vzorků.

Největší nárůst reaktivity je patrný u diagnostiky syfilis, dále u metody anti-HCV. U obou metod se jedná o průkaz protilátek, z tohoto důvodu je možné usuzovat na interferující vliv jiných, nespecifických protilátek. V období vyšetřování vzorků systémem AxSYM a metodou TP-PA se zjistily tyto počty reaktivních výsledků u kontrolních vzorků 20, u prvodárců 10 a pravidelných dárců 27. Po přechodu na systém Architect vzrostly počty reaktivních vzorků oproti očekávání nejvíce u pravidelných dárců a to na 88 vzorků za sledované období, u prvodárců bylo 8 reaktivních vzorků a reaktivních kontrolních vzorků bylo 25.

Výsledky konfirmačního vyšetření u kontrolních vzorků jsou ve většině případů negativní, bez ohledu na to, na jakém analyzátoru byl jejich předchozí screening reaktivní. Nejvíce nejasných výsledků z NRL bylo u metody anti-HCV.

Dohromady NRL potvrdila 5 pozitivních výsledků sledovaných infekcí, z toho 4 u nových dárců, toto zjištění potvrzuje předpoklad, že prvodárci jsou riziková skupina a s pravidelným dárcovstvím se zvyšuje bezpečnost krevní transfuze.

Na základě všech porovnaných parametrů lze považovat oba analyzátory za vhodné pro vyšetření dárců krve s dostatečnou specifitou a senzitivitou. Analyzátor AxSYM byl nahrazen novějším analyzátozem Architect především kvůli modernizaci přístrojového vybavení. Technologie chemiluminiscenční analýzy je upřednostňována kvůli vysoké citlivosti, jednoduchosti a spolehlivosti.

Abstract

Investigation of infectious markers of blood donors in Blood Establishment Hospital České Budějovice a.s.

The theme of the bachelor thesis is “Infectious Disease Marker Testing of Blood Donors”. According legal rules, donated blood is tested for infectious agents of AIDS, syphilis and HBV, HCV. The risk of transmission of such diseases has been decreased in recent decades nevertheless it is still a threat to transfusion medicine. Bacterial contamination is even the risk of hemotherapy which has been known for the longest time. At the Transfusion Department of the České Budějovice Hospital, Inc., the samples of blood donors are tested in the Blood Donors Analytics Laboratory. At present, all the tests are performed on a single instrument Abbott Architect. Before testing on the Architect analyzer, viral markers were tested on the Abbott AxSYM instrument, while syphilis was tested via TP-PA method using a diagnostic kit by Serodia.

The objective of the bachelor thesis is to compare the current testing systems with the previous ones, describe individual testing methods, count the numbers of reactive results and compare results of its confirmation tests, find out the frequency of reactive and positive results in new blood donors, verify results of the second confirmation of control samples.

The thesis informs about basic criteria to select blood donors, individual infectious markers which cover the infectious diseases, in which a prolonged presence of the agents in blood occurs, and thus the transmission of the infection is possible.

Further, the principles of methods used by the AxSYM analyzer, the Architect analyzer and Serodia TP-PA diagnostic kit are described. In the AxSYM analyzer, the method of enzyme immunoassay on microparticles is involved. Serodia TP-PA is used to detect antibodies against *Treponema pallidum*. The test is based on the principle of agglutination of sensitized particles in the presence of antibodies to *Treponema pallidum* in donor plasma. The Architect analyzer works using the principle of chemiluminescence, which is a detection method intended for measuring and quantification of the analyte. The content of the analyte is determined by a measurement

of chemiluminiscent emission. The AxSYM and Architect analyzers show the results automatically as a ratio of the optic density sample value to cut-off. In addition, each individual result is provided with a verbal evaluation. Cut-off value is a decisive value to distinguish negative result from the positive one. The samples showing the reactive results are sent to the National Reference Laboratory to be retested by means of the screening method and the methods working on the principle different from that used in screening test.

In the period from 1st January 2011 to 31st December 2011 17,262 blood donors were tested using the AxSYM analyzer to detect HIV, HBsAg and HCV infections. The same number of the tests was performed also by TP-PA method to diagnose syphilis. In the period from 1st February 2012 to 31st January 2013, 18,346 of blood donor samples were tested to detect HIV, HBV, HCV and syphilis. 57 samples from the total number of tests performed on the AxSYM analyzer and TP-PA diagnostic kit were reactive in the year 2011. With the installation of the Architect analyzer the numbers of reactive samples increased more than twice, namely to 121 reactive samples.

The largest increase in reactivity is evident in case of syphilis diagnostics where an increase from 11 reactive samples with TP-PA method to 49 reactive samples tested on the Architect analyzer was observed. It was the similar with anti-HCV method where an increase from 34 to 49 was recorded. In both cases, the methods for antibodies detection are involved, and so it can be taken into account the interference with other non-specific antibodies. In the period of testing by TP-PA method on the AxSYM system, 20 reactive control samples, 10 reactive first time blood donors samples and 27 reactive regular donors samples were detected. After the changeover to Architect system, the numbers of reactive samples were increased unexpectedly in regular donors the most, namely up to 88 samples within the monitored period unlike 8 reactive samples in first time donors or 25 reactive control samples.

In most cases, the confirmation test results of control samples are negative regardless the type of analyzer used for screening tests showing reactive results. The largest number of unclear results from the National Reference Laboratory (NRL) was observed with anti-HCV method.

The NRL confirmed altogether 5 positive results for the monitored infection diseases, from which 4 were in new donors. This finding confirms the assumption that the first time donors are a risk group while with the regular blood donation the safety of blood transfusion is increasing.

Based on all observed parameters the both analyzers can be regard as the safe systems for blood donors testing showing the sufficient specificity. The AxSYM analyzer was replaced by the newer Architect analyzer because of upgrading the machine equipment primarily. The chemiluminiscent test technology is preferred because of its high sensitivity, simplicity and reliability.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Vyšetření infekčních markerů u dárců krve na Transfuzním oddělení nemocnice České Budějovice a.s. vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které uvádím v příložené bibliografii.

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 Zdravotně sociální fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 3. 5. 2013

Jana Píchová

Poděkování:

Ráda bych tímto poděkovala především své vedoucí práce PharmDr. Haně Staňkové, za odborné vedení a poskytnutí důležitých informací k psaní mé bakalářské práce. Ráda bych také poděkovala všem pracovníkům z Transfuzního oddělení Nemocnice České Budějovice a.s. za jejich spolupráci.

Obsah

Úvod.....	14
1 Dárcovství krve a vyšetřování infekčních markerů u dárců krve.....	16
1.1 Historie krevní transfuze.....	16
1.2 Nábor a výběr dárců krve.....	16
1.2.1 Nábor dárců krve.....	17
1.2.2 Výběr dárců krve.....	17
1.3 Infekční markery u dárců krve.....	18
1.3.1 HIV/AIDS.....	18
1.3.2 Hepatitida B.....	20
1.3.3 Hepatitida C.....	23
1.3.4 Syfilis (příjice, lues).....	25
1.3.5 Odběr vzorku pro vyšetření infekčních markerů.....	28
2 Cíl a hypotézy práce.....	29
2.1 Cíl práce.....	29
2.2 Hypotézy.....	29
3 Metodika.....	30
3.1 Metody stanovení na analyzátoru AxSYM.....	30
3.1.1 Principy reakcí metod MEIA:.....	30
3.1.2 Test HIV Ag/Ab Combo.....	32
3.1.3 Test HBsAg.....	32
3.1.4 Test HCV version 3.0.....	33

3.2 Stanovení protilátek proti <i>Treponema pallidum</i> pomocí aglutinačního testu SERODIA-TP-PA.	33
3.2.1 Pracovní postup:	33
3.2.2 Kontroly kvality:	34
3.2.3 Vyhodnocení testu:	34
3.3 Metody stanovení na analyzátoru ARCHITECT	35
3.3.1 Potřebné reagensy:	35
3.3.2 Posloupnost reakcí metod CMIA (příloha 4):	35
3.3.3 Test HIV Ag/Ab Combo	37
3.3.4 Test HBsAg Qualitative II	37
3.3.5 Test anti-HCV	38
3.3.6 Syfilis TP	38
3.4 Vyhodnocení testů:	39
3.4.1 Vlastní vyhodnocení:	40
3.4.2 Screeningové vyšetření:	40
3.4.3 Postup při opakovaně reaktivním nebo hraničním výsledku screeningového vyšetření	41
3.4.4 Konfirmační vyšetření	41
3.4.5 Vyřazení dárce	43
4 Výsledky	44
4.1 Počet dárců	44
4.2 Počet reaktivních výsledků	45
4.3 Výsledky konfirmačního vyšetření	48
4.4 Diagnostická specifita	53

5	Diskuze	55
6	Závěr.....	58
7	Seznam použité literatury	59
8	Klíčová slova	63
9	Přílohy	64

Seznam použitých zkratk

Ab	protilátka
Ag	antigen
AIDS	syndrom získané imunodeficiencie
BWR	Bordet-Wassermanova reakce
CD	diferenční antigen (cluster of differentiation)
CMIA	chemiluminiscenční imunoanalýza
ČR	Česká Republika
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EIA	enzymová imunoanalýza
ELISA	enzymová imunoanalýzy na pevné fázi
FTA ABS	Floufescent Treponema Antibody Absorption test- test na treponemové protilátky
HBV	virus hepatitidy B
HCV	virus hepatitidy C
HIV	virus lidské imunodeficiencie
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
KFR	komplement fixační reakce
MEIA	enzymová imunoanalýza na mikročasticích
NAT	nucleic acid test, test na nukleové kyseliny
NRL	Národní referenční laboratoř
PCR	polymerázová řetězová reakce
RIBA	rekombinantní imunoblotovací analýza
RLU	relativní světelné jednotky
RNA	ribonukleová kyselina
RRR	rychlá reaginová reakce
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase
TP	Treponema pallidum
TPHA	hemaglutinační test na Treponema pallidum

TP-PA	aglutinační test na <i>Treponema pallidum</i>
VDRL	veneral disease research laboratories test - test k diagnostice syfilis
ZTS	zařízení transfuzní služby

Úvod

Tématem bakalářské práce je vyšetření infekčních markerů u dárců krve. Přestože se v posledních desetiletích riziko přenosu infekčních nemocí v darované krvi ve vyspělých státech rapidně snížilo, nelze příjemci zaručit naprosto bezpečnou krev. Vyšetření infekčních markerů u dárců krve stanovuje vyhláška č. 143/2008 Sb. Vyšetření známek infekce u dárců krve a jejich složek tvoří součást kritérií pro propouštění transfuzních přípravků pro léčebné využití. Důkladné vyšetření dárce krve zvyšuje bezpečnost vyrobeného transfuzního přípravku. Ve smyslu chápání přípravků vyrobených z lidské krve jako léčiva je nutné zajistit jejich léčebnou schopnost a to bez případných nežádoucích komplikací způsobených v důsledku přenosu infekce.

Riziko bakteriální kontaminace transfuzních přípravků je nejdéle známým rizikem hemoterapie a je dlouhodobě vnímáno jako vysoké. Nejvyšší riziko bakteriální kontaminace představují trombocytové přípravky (skladování při teplotě +22°C). Nejdéle známé infekční riziko hemoterapie je syfilis. Jeho význam a incidence kontaminace transfuzních přípravků jsou v současnosti minimalizovány díky používaným metodám skladování transfuzních přípravků a poměrně nízkému výskytu syfilis v populaci dárců v ČR. (1)

Z virových infekcí jsou v České republice dárce krve povinně testováni na nepřítomnost infekce hepatitidy B, hepatitidy C a HIV/AIDS. Nejvyšší riziko přenosu virové infekce je spojeno s erytrocytárními transfuzními přípravky. Riziko přenosu jednotlivých virových agens kolísá v závislosti na jeho výskytu v populaci dárců krve. V ČR je přibližný výskyt přenosu hepatitidy B a/nebo hepatitidy C transfuzí 1:450 000. Přenos HIV/AIDS transfuzním přípravkem byl v ČR zaznamenán naposledy v 80. letech před zavedením rutinního testování dárců krve. (1)

Mezi vyšetření prováděná v laboratoři Analytiky dárců po odběru na Transfuzním oddělení Nemocnice České Budějovice, patří protilátky anti-HIV 1/2, antigen p24 ke screeningu infekce HIV, antigen HBsAg k vyšetření hepatitidy B, protilátky anti-HCV ke stanovení hepatitidy C a protilátky proti *Treponema pallidum*. Všechna jmenovaná vyšetření se v současné době provádějí na analyzátoru Abbott Architect. Tato práce se

zabývá již zmíněným analyzátozem a také jeho předchůdcem, přístrojem Abbott AxSYM, na kterém se vyšetřovaly virové markery HIV, HCV a HBV. Syfilis se před získáním analyzátoru Architect vyšetřoval pomocí diagnostické soupravy od firmy Serodia metodou TPPA.

Sérologické testy jsou založené na průkazu protilátek, které se v krvi objevují až za několik dnů až měsíců po kontaktu s infekcí. Vyšetření protilátek je tedy v tomto časném období negativní, i pokud je dárce nakažen. U některých metod lze zkrátit diagnostické okno vyšetřením antigenu. Další možností je přímé stanovení virové nukleové kyseliny.

1 Dárcovství krve a vyšetřování infekčních markerů u dárců krve

1.1 Historie krevní transfuze

Zmínky o transfuzi je možno nalézt již ve staroegyptských, starořeckých a římských písemných památkách. Dodnes se však nenašly doklady, zda se ve skutečnosti také prováděly. Objevení krevního oběhu Wiliamem Harveyem v 17. století bylo prvním krokem při získávání poznatků o skutečné funkci krve a současně podnítilo snahy o její léčebné využití. Opakované nezdary a úmrtí související s transfuzemi zvířecí i lidské krve byly způsobené neznalostí, a tedy nerespektováním zásad slučitelnosti krve. Historie dnešní transfuzní služby začala až ve 20. století. Rozhodujícím mezníkem bylo, objevení skupinového systému ABO (Landsteiner 1901, Jánský 1907, Moss 1910), objev protisrážlivého účinku a neškodnosti citronanu sodného (r. 1914 Hustin, Agote, Lewisohn) a v neposlední řadě objev možnosti skladování krve v roztoku citronanu sodného a glukózy za použití chladu. K prudkému rozvoji transfuzní služby přispěla ve značné míře 2. světová válka. V tomto období se vytvořil základ tzv. komponentové léčby. Od používání celé krve na transfuze se postupně přešlo na používání jednotlivých složek. V současnosti se prakticky všechna odebraná krev zpracovává na jednotlivé krevní komponenty. (2, 3)

1.2 Nábor a výběr dárců krve

Zdravotní způsobilost dárce krve určuje vyhláška MZ ČR 143/2008 Sb. O stanovení bližších požadavků pro zajištění jakosti a bezpečnosti lidské krve a jejích složek (Vyhláška o lidské krvi) ve znění pozdějších předpisů. Jejím cílem je vybrat osoby vhodné pro darování krve a krevních složek pro léčebné účely a též zjistit, zda potenciální dárce krve a jejích složek (dále jen dárce) jsou zdraví. Darováním krve se

nesmí poškodit zdraví dárců, ale i příjemce transfuze se musí chránit před přenosem infekčních onemocnění a jiných škodlivin. (4, 5)

1.2.1 Nábor dárců krve

Dárcovství krve je dobrovolné a na dárce se nesmí vyvíjet nátlak. Nábor je zaměřený hlavně na bezpříspěvkové dárcovství krve. Hlavní motiv pro darování krve je nezištná pomoc jinému člověku. Rozhodující úlohu při výchově a náboru dárců má Český červený kříž. Na propagaci se využívají přednášky, plakáty, letáky, agitační články, osobní kontakt, rozhlasové a televizní vysílání zaměřené na význam a léčebné poslání krve a jejích složek, její nenahraditelnost, na podmínky a možnosti darování krve. (4)

1.2.2 Výběr dárců krve.

Dárcem krve se může stát každý, kdo splňuje stanovené limity: věk 18-65 let (prvodárci do 60 let), tělesná hmotnost ≥ 50 kg, uspokojivý zdravotní stav. Dárci po příchodu na transfuzní oddělení vyplní dotazník dárce krve, kde mimo jiné odpovídají, zda se seznámili s Poučením pro dárce krve a podpisem stvrzují, že jimi uvedené údaje jsou pravdivé. Poté se jim změří krevní tlak, puls a teplota. Ta by měla být maximálně $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, puls má být pravidelný 50-100 tepů za minutu a krevní systolický tlak nesmí být vyšší než 180 mm Hg, hodnota diastolického tlaku nesmí být větší než 100 mm Hg. Dále se před každým odběrem vyšetřuje hemoglobin, u žen nesmí být hladina nižší než 125 g/l, u mužů nižší než 135 g/l.

Způsobilost k darování krve posuzuje lékař transfuzního oddělení na základě vyplněného dotazníku dárce krve, zdravotní anamnézy, cestovatelské anamnézy, klinických a laboratorních vyšetření a osobního pohovoru. V dotazníku jsou otázky odkrývající dárcův zdravotní stav, prodělané operace, nemoci. Dále jsou dárce upozorněni na skutečnost, že zatajením důležitých skutečností, které by mohli ohrozit příjemce transfuze je postižitelné zákonem. Po odběru se z krve dárců vyšetřuje krevní skupina, Rh fenotyp, přítomnost protilátek proti erytrocytům a průkaz na infekce HIV, HBV, HCV a syfilis. Právě kvůli zmíněným infekčním markerům je velmi důležité aby

dárcovství bylo bezplatné, pouze tak lze dosáhnout co nejnižšího rizika pro příjemce. K tomu dopomáhá také pravidelné dárcovství, kdy je krev vyšetřována opakovaně. (4, 5, 6, 7)

1.3 Infekční markery u dárců krve

V této skupině jsou zařazeny infekce, u nichž dochází k delší přítomnosti původců v krvi (virémii, bakteriémii) a prostřednictvím darované krve, speciálních krevních produktů, biologických materiálů, transplantovaných orgánů či tkání, parenterálními zákroky, nástroji kontaminovanými krví, dále kontaminovanými jehlami a stříkačkami mezi intravenózními narkomany, dochází k přenosu nákazy. (8)

1.3.1 HIV/AIDS

Onemocnění, které vyvolávají viry lidské imunodeficiency (human immunodeficiency virus-HIV), bylo poprvé popsáno v roce 1981. Nyní se infekce HIV projevuje jako celosvětová pandemie. Nejvíce je postižena subsaharská Afrika. (9)

- **Klinické projevy:**

První příznaky nemoci, které připomínají spíše obyčejnou chřipku nebo angínu, se objeví za 2-6 týdnů. Po několika týdnech tyto obtíže ustoupí a člověk se opět cítí zdravý, je však infekční a v jeho těle virus napadá další buňky a tkáně. Po uplynutí jednoho nebo více roků propuká nemoc znovu. Ke klasickým příznakům patří hubnutí, zvětšení mízních uzlin, únavnost, slabost, déletrvajících průjmů a kvasinkové infekce postihující dutinu ústní. Postupně se přidávají další tzv. oportunní infekce, což jsou infekce vyvolané málo patogenními mikroorganismy, které by člověka s normálně fungující imunitou neohrozily. Toto stádium nemoci odpovídá syndromu získané imunodeficiency (acquired immunodeficiency syndrome AIDS). (9)

- **Původce:**

Původcem infekce je virus HIV, který patří do rodu Lentivirus z čeledi Retroviridae. Existují dva typy lidské imunodeficiencie: HIV-1 a HIV-2, které se liší povrchovou strukturou, patogenitou, geografickým rozložením a některými epidemiologickými charakteristikami. Většinu onemocnění vyvolává HIV-1. (8, 10)

- **Stavba virionu:**

Viriony všech lentivirů, včetně HIV, znázorněné v ultra tenkých řezech mají kulovitý tvar o průměru 110 nm. Vnitřek částice je vyplněn kónickou nukleokapsidou core, jež obsahuje RNA, enzymy a protein p24. Nukleokapsida je svým užším koncem připojena k obalu, prostor mezi obalem a nukleokapsidou je vyplněn matrixovým proteinem. Obal obsahuje kromě lipidů i glykoproteiny (glykoprotein 41, glykoprotein 120 a protein 18) buněčného původu a ční z něj 72 pravidelně uspořádaných výběžků. (10,11)

- **Patogeneze onemocnění:**

Virus poškozuje lymfocyty s povrchovým antigenem CD4. Tyto buňky jsou odpovědné za buněčnou imunitu. Tvorba protilátek, kterou zprostředkovávají B-lymfocyty, není až téměř do terminálního stádia ovlivněna. Při onemocnění AIDS se proto vyskytuje řada infekcí působených agens, u kterých je normálně imunita převážně buněčná. (12)

- **Prevence:**

Hlavním a nejdůležitějším prostředkem prevence je široké zdravotně výchovné působení na veřejnost, včetně sexuální výchovy na školách. Další tyto programy jsou zaměřené na prevenci narkomanie. Provádí se vyšetřování dárců krve, kostní dřeně, orgánů, tkání a spermatu na HIV protilátky s cílem vyloučit pozitivní osoby z dárcovství.(8)

- **Laboratorní průkaz:**

Rutiní laboratorní průkaz infekce HIV se provádí třemi možnými způsoby. Většinou se jedná o průkaz protilátek, další je kombinovaný test Ag/Ab, v některých případech je možné stanovovat samotný Ag. Protilátky proti obalovým glykoproteinům HIV se dají prokázat už za tři týdny po infekci, někdy ale až za tři měsíce i později a přetrvávají do konce života. Používají se imunoenzymatické testy typu ELISA s rekombinantními antigeny HIV-1 a HIV-2. V časně fázi je možné prokázat infekci stanovením virového antigenu p24. S rozvojem protilátkové odpovědi prokazatelnost Ag p24 většinou zaniká. Při reaktivním výsledku se vzorek zasílá do Národní referenční laboratoře pro AIDS ve Státním zdravotním ústavu v Praze. Kde se výsledek konfirmuje a je ohlášen laboratoři, kde bylo prováděno screeningové vyšetření. (10, 11, 13)

K vyšetřování dárců krve na infekci HIV je nutné dle zákona používat kombinovaný test pro stanovení antigenu i protilátek. Za dostatečnou screeningovou metodu je považován AxSYM Combo HIV test. Procento falešně pozitivních výsledků, bylo u dárců krve 0,13% se specifitou testu pro screening 99,87%. Dalším možným analyzátozem je Architect, jeho velká výhoda je krátký čas od zadání požadavku ke konečnému výsledku, propustnost metody a sama laboratorní práce. Na základě studie je Architect HIV Ag/Ab Combo test považován za nejcitlivější ve své třídě. Další výsledky ukazují, že tento test je velmi užitečný i k detekci akutní HIV infekce. Se specifitou testu 99,50% až 99,90%. Jednou z dalších možností vyšetřování HIV u dárců krve je RT-PCR. Ovšem na základě vysoké specifity testu Architect HIV Ag/Ab Combo je považován za více než dostatečný, vzhledem k tomu je vhodný i k testování do oblastí s vysokým výskytem HIV. (14, 15, 16, 17)

1.3.2 Hepatitida B

Virová hepatitida B představuje v celosvětovém měřítku jeden z největších zdravotnických problémů současnosti. Odhaduje se, že během života se virem hepatitidy B (HBV) infikuje více než dvě miliardy lidí a že v současnosti je chronicky

infikováno 350-400 milionů osob. Ročně umírají zhruba 1-2 miliony osob na přímé následky infekce HBV. (9, 18)

- **Klinické projevy:**

Onemocnění má kromě hlavního příznaku, jímž je onemocnění jater časté příznaky podobné chřipce, kloubní, kožní a neurologické. Virus HBV se interaguje do hostitelského genomu, z tohoto důvodu je jeho eliminace prakticky nemožná. Pouze pacienti bez obtíží mají nízkou nebo nedetekovatelnou hladinu viru v krvi. Do chronicity přechází HBV přibližně 5-10 % případů u dospělých s možným vznikem jaterní cirhózy či hepatocelulárního karcinomu. Pravděpodobnost tohoto přechodu je nepřímo závislá na věku infikovaného. (8, 19)

- **Původce:**

Původcem je malý DNA-virus, který je zařazen do čeledi Hepadnaviridae, rodu Orthohepadnavirus. Příslušníci čeledi mají kromě typické morfologie a zvláštního způsobu replikace některé další společné charakteristické vlastnosti jako např. velmi malý okruh hostitelů, výrazný tropismus k jaterním buňkám nebo tendenci perzistovat v organismu a navozovat vznik chronické hepatitidy, nemocí z imunokomplexů, jaterní cirhózy a hepatocelulárního karcinomu. (13)

- **Stavba virionu:**

Kompletní virion je označován jako Daneho částice. Jedná se o virus, který má velmi složitou strukturu a v lidském organismu vyvolává velmi složitý (pro DNA viry naprosto unikátní) cyklus množení viru. Velmi důležitou strukturní součástí virionu je HBsAg (hepatitis B surface antigen), což je dříve nazývaný australský antigen. V povrchu viru jsou zakotveny celkem tři podjednotky antigenu, z nichž má každá svůj přesně definovaný význam, uplatňují se například při vstupu viru do buňky. Pod obalem je dřeň neboli nukleokapsida, jejíž hlavní složkou je fosfoprotein označovaný jako HBcAg (core). Dřeň ukrývá virovou DNA a enzymy polymerázu a proteinkinázu.

Rozpustnou složkou core je HBeAg, který je možné využít ke sledování aktivity infekce. (11, 18)

- **Patogeneze onemocnění:**

HBV je primárně hepatotropní a jaterní buňky obsahují nejméně dva faktory aktivující jeho replikaci. Postupně bývá nakažena celá populace jaterních buněk a nejen hladina HBsAg, ale i titr infekčního viru v krvi dosahují extrémně vysokých hodnot, aniž se aktivuje imunitní systém. Vůbec není jasné, co nakonec imunitní systém probudí a umožní mu vyrovnat se s infekcí. (11, 13)

- **Prevence:**

Aktivní imunizace je v současnosti nejdůležitějším prostředkem k prevenci vzniku HBV infekce. Vakcíny v současnosti dostupné na našem trhu jsou připravovány rekombinantní DNA technologií. Obsahují pouze určitý fragment povrchového antigenu HBV (tj. část HBsAg) a to tu část, která je imunogenní. Výsledkem podání vakcíny je izolovaná produkce anti-HBs protilátky, která je nositelem imunity proti HBV. Mechanismus účinku anti-HBs spočívá v tom, že při kontaktu osoby účinně očkované s virem HBV dojde k navázání anti-HBs na příslušnou oblast HBsAg, čímž je znemožněn průnik HBV do hepatocytu. (18)

- **Laboratorní průkaz:**

Na celém světě je nyní k dispozici více než 40 komerčně dostupných testů k vyšetření antigenu HBs (HBsAg). Test se nejčastěji opírá o vyšetření, pomocí komerčních diagnostických souprav ELISA. U hepatitidy B jde o průkaz HBsAg, HBeAg, anti-HBs, anti-HBc a anti-HBe. Po prodělané hepatitidě může HBsAg již chybět. Z tohoto důvodu se doporučuje další testování protilátky anti-HBc, tato protilátka je přítomna na konci akutní fázi i v průběhu chronického nosičství, jejím testováním došlo ke snížení počtu transfúzí přenesených onemocněním hepatitidou B, nevýhodou tohoto stanovení je velký počet falešně pozitivních výsledků. (11, 13, 20)

I když byly testy anti-HBc IgM původně vyvinuty k testování akutní infekce, ukázalo se, že podle jejich titru je možné odlišit nosiče neaktivního HBsAg a pacienta s negativním HBeAg. Na základě výsledků studie porovnání kvantifikačních metod stanovení anti-HBc IgM bylo ukázáno, že jak enzymová imunoanalýza na mikročasticích (MEIA) tak i chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročasticích (CMIA) mají dobré funkční vlastnosti s nízkou variabilitou testu a nejsou ovlivněny revmatoidním faktorem. Přesto se do budoucna počítá s nahrazením metod MEIA za technologii CMIA, hlavně kvůli vysoké citlivosti, jednoduchosti a spolehlivosti. (21)

1.3.3 Hepatitida C

Celkově se odhaduje, že virem hepatitidy C je na světě infikováno kolem 170-200 milionů osob. Před zavedením rutinního testování dárců krve se většina osob infikovala transfuzemi krve či krevních derivátů. Nyní jsou nejohroženější skupinou především injekční uživatelé drog. Obecně se ale, kromě přímého styku s krví, HCV přenáší obtížně, i když je přítomen i ve slinách. (9, 11, 18)

- **Klinické projevy:**

Více než polovina akutních infekcí probíhá bezpříznakově, u zbývajících převládají únava a gastrointestinální příznaky, ikterus je vzácný. Závažný je přechod do chronicity, ke kterému dochází u 70-80 % infikovaných. U většiny z nich dochází ke vzniku chronické aktivní hepatitidy, případně cirhózy, možný je i vznik hepatocelulárního karcinomu. Závažnost jaterního postižení a přechod do cirhózy ovlivňuje především věk v době nákazy a trvání infekce. (8)

- **Původce:**

Virus hepatitidy C je RNA virem patřící do čeledi Flaviviridae, rod Hepacavirus. V současnosti se rozlišuje 6 genotypů, z nichž některé mají subtypy. Jednotlivé genotypy mají rozdílné geografické zastoupení, vyvolávají odlišný klinický průběh a jsou různě citlivé na léčbu. (8, 18)

- **Vlastnosti virionu:**

Vir obsahuje jediný gen kódující polyprotein, jenž je podroben štěpení na jednotlivé strukturální a nestrukturální proteiny. Strukturální proteiny jsou tvořeny povrchovými proteiny E1 a E2, třetím strukturálním proteinem je Core antigen. Funkce řady nestrukturálních proteinů je známa, nicméně funkce několika dalších je tajemstvím. Srovnání sekvence nukleotidů v různých izolátech ukázalo na neobvyklou heterogenitu HCV. (11, 18)

- **Patogeneze onemocnění:**

In vivo se virus množí nejen v hepatocytech, ale i v B-lymfocytech, a to do extrémně vysokých hodnot- denně vznikají miliardy nových virionů. Na RNA závislá RNA-polymerasa, ale nedovede korigovat chyby vznikající při replikaci. Což znesnadňuje imunitnímu systému vypořádat se s virovou infekcí. Infekce má proto sklon přecházet do chronicity a perzistovat. Za postižení jater do značné míry odpovídá jednak imunitní reakce, tvorba prozánětlivých cytokinů, tak i autoimunitní pochody. (13)

- **Prevence:**

Dodržování hygienicko-epidemiologického režimu ve zdravotnických i nezdravotnických zařízeních. Výběr a vyšetřování dárců krve (tkání, orgánů). Vyloučení osob s anti-HCV z dárcovství krve (tkání, orgánů). Výměnné programy jehel a stříkaček u narkomanů. (8)

- **Laboratorní průkaz:**

Průkaz infekce HCV je založen na průkazu protilátek IgG metodou ELISA, konfirmační technikou je imunoblotovací technika RIBA (recombinant immunoblot assay). Existují i kombinované testy Ag/Ab. Nejcitlivější metodou průkazu aktivní infekce HCV je stanovení virových RNA v séru, eventuelně i v mononukleárech

periferního oběhu pomocí PCR. Nález bývá pozitivní již počátkem 2. týdne po infekci. (11, 13)

Analyzátor AxSYM používá ke stanovení protilátek anti-HCV metodu založenou na principu MEIA. Jedná se o vysoce citlivý a specifický test, díky kterému došlo k výraznému snížení přenosu hepatitidy C krevní transfuzí. Metody stanovení anti-HCV založené na principech MEIA i CMIA jsou běžně používané screeningové metody. Doporučují se používat k vyšetřování osob s nízkou prevalencí, protože jejich velká nevýhoda je falešná pozitivita u vzorků s nízkými titry, další překážkou je dlouhé období (asi 45-68 dní) právě do vzniku protilátek, které se stanovují. Stejně tak nedokáže imunoanalýza rozpoznat v případě pozitivního výsledku, zda se jedná o infekci akutní, prodělanou v minulosti nebo přetrvávající. Z tohoto důvodu je potřeba, vyšetřit například HCV RNA nebo test na HCV Ag. Stanovení HCV Core Ag je relativně snadné, levné a nevyžaduje speciální vybavení, oproti stanovení RNA molekulárními technikami. Nechá se například stanovit na analyzátoru Architect spolu s protilátkami. (22, 23)

1.3.4 Syfilis (příjice, lues)

Je pohlavní nákaza postihující dospělou populaci, především v období vrcholné sexuální aktivity ve věku 16-30 let, a novorozence infikované v průběhu nitroděložního života matkou. Výskyt syfilis u nás prudce klesl v poválečném období, řadu let se udržoval bez větších změn na nízké úrovni (300-500 nových případů za rok). V posledních letech dochází opět k vzestupu, zejména ve skupinách populace se zvýšenou promiskuitou. Vzácněji může být infekce přenesena také nepohlavně, kontaktem s kožními projevy infekce, případně kontaktem s krví či tělními tekutinami. (11, 24)

- **Klinické projevy:**

Průběh infekce u dospělých se rozděluje na tři stádia:

I. stádium vzniká 2 až 3 týdny po kontaktu se zdrojem, objevuje se primární léze-tvrký vřed, který je lokalizovaný především na genitáliích, ale může se vyskytovat i v orofaciální oblasti (rty, ústní dutina).

II. stádium začíná přibližně za 2 týdny po zahojení vředu, je charakteristické celkovými příznaky jako je malátnost, bolest v kloubech, horečka, anémie aj. Objevuje se kožní vyrážka zejména na trupu a na končetinách. Na sliznici vznikají eroze, nejčastější jsou v ústech a na patře, dochází ke zvětšení lymfatických uzlin.

III. stádium je orgánová syfilis a vzniká až za několik let po infekci. Pacient obvykle již není infekční. Hlavním příznakem je chronická granulomatózní reakce, která vede k nekróze a k fibrotizaci. Tyto tuhé léze mohou infiltrovat kterýkoliv orgán, postupně se zvětšují, hojí, zanechávají jizvy. Nejzávažnější je postižení centrální nervové soustavy a kardiovaskulárního ústrojí. (45)

- **Původce:**

Treponema pallidum, treponemata jsou spirální organismy 5-20 μm dlouhé, tenké s pravidelnými závitmi. Treponema pallidum obsahuje antigeny, které jsou společné pro většinu treponem a jsou patrně bílkovinné povahy. Protilátky proti těmto antigenům mohou být příčinou falešně pozitivních sérologických reakcí. (13)

- **Prevence:**

Uplatňování zásad bezpečného sexu. Sérologické vyšetřování těhotných žen, dárců krve, orgánů a tkání. Vyhledávání, vyšetřování a léčení nemocných. Povinné hlášení nemocných. (8)

- **Laboratorní průkaz:**

Mikroskopický průkaz: Nejlépe z *ulcus durum* v temném poli. Lze pozorovat šroubovitý pohyb treponem. Ve tkáni lze znázornit treponemy stříbřením, imunofluorescencí, případně molekulárně genetickými metodami.

Sérologická diagnostika:

Netreponemové testy: používá se Ag z hovězího srdečního svalu, kardiolipin. Základními testy pro screeningové vyšetření jsou rychlá reaginová reakce (RRR) a komplementfixační reakce Bordet-Wassermannova (BWR), dále se provádějí různé precipitační reakce, např. VDRL, ty jsou málo specifické, ale za to nenáročné na provedení. Jejich výhodou je, že se stanou negativními při vyléčení, na rozdíl od protilátek specifických.

Treponemové testy: V dnešní době se jedná především o stanovení specifických protilátek proti *Treponema pallidum*. Základními testy jsou ELISA a aglutinační test na *Treponemu pallidum* (TPPA), většina laboratoří používá jeden z nich jako screening a druhý jako test konfirmační. Některé testy se provádějí tak, že se sérum napřed vysytí sorbetem z nepatogenních treponem, jde např. o test nepřímé hemaglutinace TPHA a imunofluorescenční FTA-Abs. Klasickým, když dnes téměř nepoužívaným testem je Nelsonův imobilizační test se živými treponemami. Jde o standard, ale je obtížný a rizikový, navíc může být nespecificky pozitivní za přítomnosti antibiotik.

Na základě studie, která porovnávala testy EIA a TPPA bylo zjištěno, že v případě TPPA negativních a EIA reaktivních výsledků se jedná buď o staré případy onemocnění, nebo se jednalo o interferenci u HIV infikovaných osob. Rozdíly mezi těmito vyšetřeními jsou poměrně známé, proto se pro potvrzení reaktivní reakce doporučuje provedení ještě jedné imunoanalýzy nebo imunoblotu. Další možností stanovení specifických protilátek je CMIA. Její shoda s EIA je 98,7 % a s hemaglutinačním testem na *Treponemu pallidum* 99,3 % z toho plyne, že je minimálně stejně citlivá jako jiné EIA techniky. Hlavní předností testování CMIA je jednoduché provedení a nízké náklady. Vyšetření metodou Kontaktní *Treponema* Screen (CMIA) je velmi dobrou alternativou k tradičním vyšetřovacím metodám, má srovnatelnou specifitu a vyšší citlivost a to především u testování vzorků v primární fázi

onemocnění syfilis. Jako ideální screeningový test se tedy jeví Kontaktní Treponema Screen, jako i další techniky CMIA právě díky vysoké citlivosti, specifčnosti a snadné automatizaci. Jediným testem se 100% specifitou je Imunoblot, který se používá jako jeden z konfirmačních testů. (12, 23, 25)

1.3.5 Odběr vzorku pro vyšetření infekčních markerů

K testování se používá plazma dárce. Pro odběr nesrážlivé krve je vhodné použít jako protisrážlivé přísady EDTA či heparin. Při odběru se dbá na to, aby vzorek nebyl nepřiměřeně naředěn (např. antikoagulačním roztokem). Vzorky se odeberou v den darování krve nebo její složky. Zkumavka pro odběr se předem označí čárovým kódem, který se shoduje s kódem nacházejícím se na dotazníku, odběrovém vaku a ostatních zkumavkách daného dárce. Po odběru se zkumavky přepraví do laboratoře analytiky dárce k samotnému vyšetření, které se provádí téhož dne. Pokud nelze vyšetření provést téhož dne uchovávají se vzorky při teplotě 2-8°C, pokud nebudou vyšetřeny do 7 dnů, odsaje se plazma a ta se uskladní při teplotě -20°C a nižší. (26, 27, 28)

Krevní vzorky se připravují společně pro HIV Ag/Ab Combo, anti-HCV, HBsAg a syfilis. Vakuety se centrifugují 20 minut při 3500-4000 ot/min, minimální podmínky jsou 150 000 g-minut (g-minuty = relativní odstředivá síla RCF x počet minut otáčení). Je nutné zkontrolovat vzorky na přítomnost pěny a bublin, pěnu a bubliny před uložením do analyzátoru odstranit. Centrifugaci ve vysokootáčkové centrifuze je nutno provést vždy při opakování vyšetření a po rozmražení vzorku.

U vzorku s lipemickou vrstvou na povrchu je třeba přenést čistou plazmu nebo sérum do další zkumavky. Nelze použít vzorky inaktivované teplem.

Minimální objem vzorku: liší se podle typu nádoby se vzorkem. Při použití primárních a aktivních zkumavek se pomocí rysky určující předepsanou výšku hladiny zjišťuje, zda obsahují dostatečný objem vzorků. Při použití vzorkového kelímku, pro základní vyšetření: 150 ul, každé opakování ze stejného kelímku: dalších 100 ul. (28, 29)

2 Cíl a hypotézy práce

2.1 Cíl práce

Cílem práce je porovnání počtu reaktivních výsledků při vyšetřování na analyzátorech AxSYM a Architect, porovnání výsledků jejich konfirmačních vyšetření. Zjistit četnost reaktivních výsledků u nových dárců (prvodárců). U kontrolních vzorků ověřit výsledky druhé konfirmace. Procentuelně vyjádřit počet pozitivních výsledků potvrzených z NRL. Spočítat diagnostickou specifickou u jednotlivých metod a analyzátorů.

2.2 Hypotézy

- S přechodem na nový vyšetřovací systém se zvýší počet reaktivních výsledků.
- Vyšší záchyt falešně reaktivních výsledků bude u prvodárců nebo opakovaných dárců.
- Vyšší záchyt pozitivních výsledků bude u prvodárců.
- Výsledky konfirmace u kontrolních vzorků budou opakovaně nejasné.
- S novým vyšetřovacím systémem se zvýší bezpečnost krevní transfuze.
- Pravidelné darování krve snižuje riziko přenosu infekčních onemocnění.

3 Metodika

Tato kapitola obsahuje principy metod jednotlivých analyzátorů, jednotlivé testy jejich kalibrace a kontroly kvality.

3.1 Metody stanovení na analyzátoru AxSYM

Analyzátor AxSYM (příloha 1) se používal na Transfuzním oddělení pro vyšetření dárců krve do února roku 2012, kdy byl nahrazen analyzátozem Architect (viz dále).

Analyzátor AxSYM se používal k vyšetření infekčních markerů (anti HIV-1/ HIV-2 a antigenu HIV p24, anti-HCV, HBsAg) u dárců za použití enzymové imunoanalýzy na mikročásticích (MEIA). (28)

3.1.1 Principy reakcí metod MEIA:

Technologie enzymové imunoanalýzy na mikročásticích využívá k měření analytů roztok suspendovaných submikronových latexových částic. Tyto částice jsou potaženy záchyťovými molekulami specifickými pro měřený analyt. Účinný povrch mikročástic zvyšuje kinetiku metody a snižuje dobu inkubace. Metody MEIA tedy trvají kratší dobu než jiné imunoanalýzy. (30)

3.1.1.1 Potřebné reagensie

- Mikročástice potažené záchyťovými molekulami (antigeny, protilátkami nebo virovými částicemi, lišícími se podle vyšetřovaného markeru).
- Pracovní roztoky: 1-fluorescenční substrát, 4-methylumbelliferylfosfát (MUP).
- Konjugát s alkalickou fosfatázou. (30)

3.1.1.2 Posloupnost reakcí metod MEIA:

Analyt se naváže na mikročástice za vzniku imunokomplexu. (Vzorek a mikročástice se smíchají a inkubují při reakční teplotě.)

Imunokomplex se naváže na skleněná vlákna matrice (příloha 2). Procesní jehla nasaje reakční směs z inkubační jamky a nadávkuje jí na reakční matici, kde se

imunokomplex ireverzibilně váže na skleněná vlákna matrice. Reakční matrice se promyje, aby se odstranil nenavázaný materiál. Imunokomplex je zachycen skleněnými vlákny, zatímco nadbytečná reakční směs rychle proteče velkými póry v matrici.

Procesní jehla přenesení konjugát s alkalickou fosfatázou z reakční nádoby na reakční matrici. Konjugát se naváže na imunokomplex, čímž vznikne sendvič protilátka-analyt-konjugát. Matrice se znovu promyje.

Dávkoč pracovního roztoku 1 nadávkuje na reakční matrici substrát 4-methylumbelliferylfosfát (MUP). Konjugát s alkalickou fosfatázou katalyzuje hydrolyzu MUP na 4-methylumbelliferon (MU).

MEIA optika měří rychlost, jakou na matrici vzniká fluorescenční produkt MU. Rychlost tvorby MU na matrici je přímo úměrná koncentraci analytu v testovaném vzorku. (30)

3.1.1.3 Kalibrace:

Každá metoda musí být kalibrována před analýzou vzorků. Způsob kalibrace je dán pro každou metodu. Provádí se při použití nové šarže vyšetřovací soupravy, při instalaci nové metody nebo nové verze stávající metody. Pokud některá s kontrol byla mimo specifikovaný rozsah. Jakmile jsou změřeny hodnoty kalibrátorů, analyzátor vypočte jejich průměr, který poslouží ke stanovení cut-off pro danou metodu a šarži. (28, 31)

3.1.1.4 Kontroly kvality:

Vyšetření kontrol se provádí před vyšetřením vzorků. Vyšetřují se kontroly dodávané firmou Abbott a tzv. nezávislá pozitivní kontrola Accurun 1. Analyzátor kontroluje výsledky podle nastaveného rozmezí. V případě nevyhovujícího výsledku kontrolních vzorků se vyšetření zopakuje, pokud trvá nevyhovující výsledek, provede se kalibrace dané metody. Při dalším nevyhovujícím výsledku kontroly kvality se zkalibruje jiná šarže dané reagentie, případně se použije jiná šarže dané kontroly. V případě nevyhovujícího výsledku kontrol se kontaktuje servisní technik. (28)

3.1.2 Test HIV Ag/Ab Combo

Metoda Axsym HIV Ag/Ab Combo je enzymová imunoanalýza na mikročasticích k souběžné kvalitativní detekci protilátek proti viru lidského imunodeficitu typu 1 a 2 (anti-HIV-1/HIV-2) a antigenu p24 v lidském séru či plazmě. V metodě je využito páru myších monoklonálních protilátek anti-p24 navázaných na mikročasticích v sondě ještě před sérokonverzí, čímž se zkracuje sérokonverzní okno a zlepšuje se včasná detekce infekce HIV. Reakční souprava obsahuje mikročastice potažené rekombinantními antigeny HIV (E. Coli) k zachycení antigenu p24 a myší monoklonální protilátky anti-HIV p24 značené biotinem. Komplexy značené biotinem jsou detekovány pomocí konjugátu anti-biotinových protilátek s alkalickou fosfatázou. Přítomnost či nepřítomnost protilátek anti-HIV-1/HIV-2 nebo antigenu p24 ve vzorku se určuje na základě porovnání rychlosti tvorby fluorescenčního produktu s hodnotou cut-off, která je vypočtena na základě předem provedené indexové kalibrace. Je-li rychlost fluorescenčního produktu ve vzorku vyšší nebo rovna hodnotě cut-off, je vzorek považován za reaktivní na protilátky a/nebo antigen p24. (31)

3.1.3 Test HBsAg

Metoda AxSYM HBsAg se používá ke stanovení povrchového antigenu hepatitidy B, používají se mikročastice potažené myšími monoklonálními protilátkami anti-HBs třídy IgM a protilátky anti-HBs značené biotinem. Pokud je ve vzorku přítomen HBsAg vznikne v reakční směsi komplex protilátka-antigen-protilátka, na který se naváže konjugát anti-biotinových protilátek s alkalickou fosfatázou. Přítomnost či nepřítomnost HBsAg ve vzorku se určuje na základě porovnání rychlosti tvorby fluorescenčního produktu s hodnotou cut-off, která je vypočtena na základě předem provedené indexové kalibrace. Je-li rychlost fluorescenčního produktu ve vzorku vyšší nebo rovna hodnotě cut-off, je vzorek považován za reaktivní. (31)

3.1.4 Test HCV version 3.0

Metoda AxSYM HCV version 3.0 slouží ke kvalitativní detekci protilátek proti viru hepatitidy C (anti-HCV) v lidském séru nebo plazmě. Reakční souprava obsahuje mikročástice potažené antigenem HCV. Pokud jsou ve vzorku přítomny protilátky anti-HCV navážou se na mikročástice, čímž vznikne komplex antigen-protilátka. Na ten se naváže konjugát kozích protilátek proti lidskému IgG s alkalickou fosfatázou. Přítomnost či nepřítomnost protilátek anti-HCV ve vzorku se určuje na základě porovnání rychlosti tvorby fluorescenčního produktu s hodnotou cut-off, která je vypočtena na základě předem provedené indexové kalibrace. Je-li rychlost fluorescenčního produktu ve vzorku vyšší nebo rovna hodnotě cut-off, je vzorek považován za reaktivní. (31)

3.2 Stanovení protilátek proti *Treponema pallidum* pomocí aglutinačního testu SERODIA-TP-PA.

Tento test se využíval k vyšetřování dárců krve do února roku 2012, než jej nahradilo vyšetřování na analyzátoru Architect (viz dále).

Slouží k průkazu specifických protilátek proti *Treponema pallidum*. Obsahuje jako nosič antigenu želatinové částice senzibilizované purifikovanou patogenní *Treponema pallidum*. Test je založen na principu aglutinace senzibilizovaných částic v přítomnosti protilátek proti *T. pallidum* v lidské plazmě či séru (tzv. pasivní aglutinace). (28)

3.2.1 Pracovní postup:

Do předem popsané mikrotitrační destičky provede rozkapání vzorků rozplňovač QUASAR podle pokynů obsluhy. Vzorky se kapou v objemu 25 µl do 1., 5. a 9. jamky v každém dvanáctijamkovém řádku mikrodestičky typu „U”.

Pomocí kalibrované pipety se do jamek obsahujících vzorek přidá 100 µl ředícího roztoku a do 3 následujících jamek 25 µl ředícího roztoku.

Obsah jamek (č. 1) obsahujících vzorek s ředícím roztokem je nutné důkladně promíchat opakovaným nasáváním a vypouštěním tekutiny. Po-té se z těchto jamek

přenesení 25 µl směsi do jamky následující (č. 2), kde se směs opět důkladně promíchá s ředícím roztokem a postup se opakuje ještě u dalších dvou následujících jamek (č. 3, 4) tak, aby bylo dosaženo sériového dvojitého ředění vzorku.

Do jamek č. 3 se kápne 25 µl roztoku nesenzibilizovaných částic a do jamek č. 4 25 µl roztoku senzibilizovaných částic.

Obsah jamek důkladně promíchat, po dobu přibližně 30 vteřin na vibrační třepače, destičku přikrýt víčkem a nechat inkubovat 2 hodiny při laboratorní teplotě (15-30 °C)

Výsledky se odečítají vizuálně makroskopicky. (28, 32)

3.2.2 **Kontroly kvality:**

Vyšetření kontrol se provádí společně s vyšetřením vzorků. Vyšetřuje se kontrola dodávaná firmou Serodia a tzv. nezávislá pozitivní kontrola Accurun 1. Výsledky kontrol se odečítají společně s testovanými vzorky. (28)

3.2.3 **Vyhodnocení testu:**

Vyšetření v jamce s nesenzibilizovanými částicemi má být negativní. Makroskopické obrazy jamek s jednotlivými výsledky jsou v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Hodnocení výsledků vyšetření TPPA

Zdroj: příbalový leták setu TP-PA, firma SERODIA

Možné nálezy	Hodnocení
Částice koncentrované ve tvaru tečky s hladkým, kulatým, vnějším okrajem ve středu jamky.	(-)
Částice koncentrované ve tvaru kompaktního prstence s hladkým, kulatým vnějším okrajem.	(+)
Rozlehlý prstenec s hrubým, přesně neohrazeným vnějším okrajem a periferní aglutinace.	(+)

Možné nálezy	Hodnocení
Aglutinované částice uniformě rozprostřeny na celém dně jamky.	(++)

3.3 Metody stanovení na analyzátoru ARCHITECT

Analyzátor Architect (příloha 3) se používá na Transfuzním oddělení pro vyšetření dárců krve od února roku 2012, kdy nahradil analyzátor AxSYM .

Přístroj Architect pracuje na principu chemiluminiscence (CMIA), je to detekční metoda pro měření a kvantifikaci koncentrace analytu.

3.3.1 Potřebné reagensy:

- Paramagnetické mikročástice potažené záchytovými molekulami (Ag, Ab nebo virovými částicemi), které odpovídají měřenému analytu
- Akridiniový konjugát
- Pre-Tigger a Tigger (29)

3.3.2 Posloupnost reakcí metod CMIA (příloha 4):

V průběhu zpracování vzorku nadávkuje pipetor paramagnetické mikročástice do reakční nádoby obsahující vzorek. Během inkubační doby je reakční směs promíchána ve třepačce. Dojde k inkubaci reakční směsi a analyt obsažený ve vzorku se naváže na záchytové molekuly, na mikročásticích za vzniku imunokomplexu. Po uplynutí inkubační doby přitáhne magnet paramagnetické částice ke stěně reakční nádoby. Reakční směs se propláchne, kvůli odstranění nenavázané látky. Pipetor nadávkuje konjugát značený chemiluminiscenčním akridinem. Konjugát se naváže na imunitní komplex a vytvoří finální reakční směs. Dojde k inkubaci reakční směsi. Dávkovač mycí zóny propláchne reakční směs a odstraní nenavázané látky. Po nadávkování Pre-Tiggeru (peroxid vodíku) provede optický systém CMIA čtení pozadí. Pre-Tigger

vytváří kyselé prostředí, které zabraňuje předčasnému uvolnění energie, pomáhá předcházet shlukování mikročástic, slouží k odštěpení akridinového barviva z konjugátu navázaného na komplex mikročástice. Následuje dávkování Tiggeru (hydroxid sodný). Je-li akridinium vystaveno působení peroxidu a zásaditého roztoku, projde oxidační reakcí. Tato reakce vede ke vzniku chemiluminiscenční reakce. Vzniká N-methylakridon a při návratu do základního energetického stavu uvolní energii ve formě emise světla. Obsah analytu je zjišťován na základě měření chemiluminiscenční emise (aktivované čtení), které po předem stanovenou dobu provádí optický systém CMIA. Výsledky měření jsou použity ke kvantitativnímu vyjádření koncentrace analytu nebo k určení kvalitativní interpretaci pro indexové (cut-off) metody. (29, 33)

3.3.2.1 Kalibrace:

Každá metoda musí být kalibrována před analýzou vzorků. Způsob kalibrace je dán pro každou metodu. Provádí se při použití nové šarže vyšetřovací soupravy, při instalaci nové metody nebo nové verze stávající metody, pokud některá s kontrol byla mimo specifikovaný rozsah. Jakmile jsou změřeny hodnoty kalibrátorů, analyzátor vypočte jejich průměr, který poslouží ke stanovení cut-off pro danou metodu a šarži. (29, 33)

3.3.2.2 Kontroly kvality:

Vyšetření kontrol se provádí před vyšetřením vzorků. Vyšetřují se kontroly dodávané firmou Abbott a tzv. nezávislá pozitivní kontrola Accurun 1 a pozitivní kontrola na syfilis Accurun 155. Analyzátor kontroluje výsledky podle nastaveného rozmezí. V případě nevyhovujícího výsledku kontrolních vzorků se vyšetření zopakuje, pokud trvá nevyhovující výsledek, provede se kalibrace dané metody. Při dalším nevyhovujícím výsledku kontroly kvality zkalibruje jiná šarže dané reagentie, případně se použije jiná šarže dané kontroly. V případě nevyhovujícího výsledku kontrol se kontaktuje servisní technik. (29)

3.3.3 Test HIV Ag/Ab Combo

Metoda Architect HIV Ag/Ab Combo je dvoukroková imunoanalýza ke stanovení přítomnosti antigenu HIV p24 a protilátek anti-HIV-1 a anti-HIV-2 v lidském séru a plazmě využívající technologii chemiluminiscenční imunoanalýzy na mikročasticích s tzv. flexibilními protokoly. Tato technologie se nazývá Chemiflex. Během prvního kroku se vzorek smíchá s promývacím pufrem, ředícím roztokem pro metodu a paramagnetickými mikročasticemi. Antigen p24 a protilátky anti-HIV-1/HIV-2 přítomné ve vzorku se naváží na mikročástice potažené antigeny a myšími monoklonálními protilátkami. Po promytí se antigen a protilátky naváží na konjugát s akridinem. Po dalším promývacím cyklu se do reakční směsi přidají Pre-Tigger a Tigger. Výsledná chemiluminiscenční reakce se měří v relativních světelných jednotkách (RLU – Relative Light Units). Množství antigenu a protilátek ve vzorku je přímo úměrné signálu v jednotkách RLU detekovanou optikou systému. Přítomnost či nepřítomnost antigenu p24 nebo protilátek anti-HIV-1/HIV-2 se určuje na základě porovnání hodnoty chemiluminiscenčního signálu v reakci s hodnotou cut-off, která je vypočtena na základě kalibrace metody. (34)

3.3.4 Test HBsAg Qualitative II

V průběhu infekce HBV produkuje velké množství povrchového antigenu HBsAg, označovaného také jako australský antigen, který lze v krvi infikovaných jedinců detekovat. HBsAg je první sérologický marker infekce HBV, který se objevuje 1 až 10 týdnů po expozici a 2 až 8 týdnů před nástupem klinických symptomů. HBsAg přetrvává během akutní infekce a vymizí v období pozdní rekonvalescence. (25)

Metoda Architect HBsAg Qualitative II je jednokroková imunoanalýza na mikročasticích ke kvalitativní detekci povrchového antigenu viru hepatitidy B na mikročasticích s tzv. flexibilními protokoly. Tato technologie se nazývá Chemiflex. Během prvního kroku se vzorek smíchá s paramagnetickými mikročasticemi potaženými protilátkami anti-HBs a konjugátem anti-HBs s akridinem. Antigen HBsAg přítomný ve vzorku se naváže na mikročástice potažené protilátkami anti-HBs a na protilátky anti-HBs konjugované s akridinem. Po promytí se do reakční směsi přidá

pomocný promývací pufr. Po dalším promývacím cyklu se do reakční směsi přidají Pre-Tigger a Tigger. Výsledná chemiluminiscenční reakce se měří v relativních světelných jednotkách. Množství antigenu a protilátek ve vzorku je přímo úměrné signálu v jednotkách RLU detekovanou optikou systému. Přítomnost či nepřítomnost antigenu HBsAg se určuje na základě porovnání hodnoty chemiluminiscenčního signálu v reakci s hodnotou cut-off, která je vypočtena na základě kalibrace metody. (34)

3.3.5 Test anti-HCV

Metoda Architect anti-HCV je dvoukroková chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročasticích ke kvantitativní detekci protilátek proti viru hepatitidy C. Během prvního kroku se vzorek smíchá s ředícím roztokem pro metodu a paramagnetickými mikročasticemi potaženými rekombinantním antigenem HCV. Protilátky anti-HCV přítomné ve vzorku se naváží na mikročastice potažené HCV. Po promytí se během druhého kroku přidá konjugát anti-lidských protilátek s akridinem. Po dalším promývacím cyklu se do reakční směsi přidají Pre-Tigger a Tigger. Výsledná chemiluminiscenční reakce se měří v relativních světelných jednotkách. Množství antigenu a protilátek ve vzorku je přímo úměrné signálu v jednotkách RLU detekovanou optikou systému. Přítomnost či nepřítomnost protilátek anti-HCV se určuje na základě porovnání hodnoty chemiluminiscenčního signálu v reakci s hodnotou cut-off, která je vypočtena na základě kalibrace metody. (34)

3.3.6 Syfilis TP

Metoda Architect syfilis TP je dvoukroková imunoanalýza ke kvantitativnímu stanovení protilátek anti-TP v lidském séru či plazmě využívající technologii chemiluminiscenční imunoanalýzy na mikročasticích s tzv. flexibilními protokoly. Tato technologie se nazývá Chemiflex. Během prvního kroku se vzorek smíchá s ředícím roztokem pro metodu a paramagnetickými mikročasticemi potaženými rekombinantními antigeny. Protilátky anti-TP přítomné ve vzorku se naváží na mikročastice potažené antigeny TP. Po promytí se během druhého kroku přidá konjugát protilátek proti lidskému IgG a IgM s akridinem. Po dalším promývacím cyklu se do reakční směsi

přidají Pre-Tigger a Tigger. Výsledná chemiluminiscenční reakce se měří v relativních světelných jednotkách. Množství antigenu a protilátek ve vzorku je přímo úměrné signálu v jednotkách RLU detekovanou optikou systému. Přítomnost či nepřítomnost protilátek TP se určuje na základě porovnání hodnoty chemiluminiscenčního signálu v reakci s hodnotou cut-off, která je vypočtena na základě kalibrace metody. (34)

3.4 Vyhodnocení testů:

Pro správné hodnocení laboratorního výsledku je nutné znát nejen parametry analytické, ale i klinické vlastnosti. V ideálních případech dává test pozitivní výsledek u všech nemocných, zatímco všichni zdraví jedinci mají výsledek testu negativní. Převážná většina testů dává pozitivní výsledek i u malé části zdravé populace, zatímco určitá část nemocných má zase výsledek testu negativní. Jako klinické vlastnosti laboratorní metody rozlišujeme diagnostickou senzitivitu vyjadřující pravděpodobnost, že výsledek testu bude pozitivní, je-li vyšetřovaná osoba nemocná. Diagnostickou specifickou, která vyjadřuje pravděpodobnost negativního výsledku u zdravé osoby. A diagnostickou efektivitu představující pravděpodobnost, že metoda bude poskytovat pozitivní výsledky u nemocných a zároveň negativní výsledky u zdravé populace. Jejich hodnota se pohybuje od 0 do 100% a je žádoucí aby diagnostické testy dosahovaly co nejvyšších hodnot senzitivity i specifické. U dárců krve se předpokládá, že se jedná o zdravou populaci, proto se nejvíce uplatňuje diagnostická specifická. Ovšem z celkového pohledu na screeningové metody je prvořadá diagnostická senzitivita. (35)

V hodnocení výsledku je nutné si uvědomit, že hodnota cut-off nám formálně rozděluje pole výsledků na negativní a pozitivní, ve většině případů se tyto hodnoty částečně překrývají. Hladina cut-off je arbitrální (dohodnutá) k rozlišení negativního a pozitivního výsledku. Určuje se podle charakteru infekce, pro kterou se stanovuje, pokud se jedná o závažné infekce, volí se cut-off hodnota tak, aby zachytila všechny infikované. Kolem ní existuje tzv. šedá zóna. Což je interval hodnot, v němž lze nalézt jak falešně negativní, tak falešně pozitivní výsledky, ale také některé skutečně negativní a pozitivní výsledky. Pro screeningové testy se používá arbitrální posunutí hranice cut-off, čímž můžeme zajistit, že nám neunikne žádný pozitivní výsledek. Jako určitou daň

za dobrou senzitivitu testu, lze považovat pro ZTS zvýšení počtu falešně pozitivních výsledků z důvodu nižší specifčnosti testu. Nerespektování fenoménu šedé zóny je jednou z nejčastějších chyb v sérologické diagnostice. (36, 37)

3.4.1 Vlastní vyhodnocení:

Vyhodnocení provádí automaticky analyzátor. Výsledek vydává číselně jako poměr hodnoty optické denzity vzorku (S) a cut-off (CO), tzv. S/CO. Ke každému vzorku i kontrole zároveň vydává slovní vyhodnocení. (29)

3.4.2 Screeningové vyšetření:

Interpretace vstupního vyšetření HIV, HBV, HCV:

- **negativní** (S/CO je menší než 0,90)
- **hraniční/šedá zóna** (S/CO je v rozmezí 0,90-0,99)
- **reaktivní** (S/CO je větší nebo rovno 1) – označí se jako „iniciálně reaktivní“

Interpretace vstupního vyšetření syfilis:

- **negativní** (S/CO je menší než 0,99)
- **reaktivní** (S/CO je větší nebo rovno 1) – označí se jako „iniciálně reaktivní“

Při reaktivitě nebo u hraničního výsledku vstupního vyšetření se provádí 2x opakované vyšetření téhož vzorku stejným postupem jednotlivě ve 2 následujících sériích (nejlépe každá série na jiném analyzátoru) nebo ve dvojici v 1 sérii.

Interpretace opakovaných vyšetření:

- **negativní** – výsledek 1x reaktivní nebo hraniční, 2x negativní
- **opakovaně reaktivní**
 - výsledek 2x reaktivní nebo hraniční, 1x negativní,
 - výsledek 3x reaktivní nebo hraniční (29)

3.4.3 Postup při opakovaně reaktivním nebo hraničním výsledku screeningového vyšetření

Pokud je screeningové vyšetření opakovaně reaktivní nebo opakovaně hraniční vyřadí se odběr i transfuzní přípravky z něj vyrobené z léčebného použití a dárce se dočasně vyřadí z dárcovství. Laboratoř bezodkladně pošle do NRL tentýž vzorek v dostatečném objemu k první confirmaci, současně si laboratoř ponechá zmraženou plazmu z daného odběru, dokud neobdrží výsledek confirmace, pro potřeby případných následných vyšetření. Provede se předběžný look-back, kde se pozastaví výdej transfuzních přípravků daného dárce, jsou-li ještě na skladě, případně se informuje odběratel takového transfuzního přípravku. Zařízení Transfuzní služby je povinné nahlásit look-back i zpracovateli plazmy. (16, 27)

Look-back se používá k vyhledání rizikových odběrů v případě reaktivních výsledků screeningového vyšetření na infekci HIV, HBV, HCV u dárce krve. Za rizikové odběry považují všechny provedené v předcházejících šesti měsících poslednímu nereaktivnímu odběru. (26)

3.4.4 Konfirmační vyšetření

Konfirmační vyšetření provádí NRL způsobem a metodami, které zahrnují i testy založené na odlišném principu, než je screeningové vyšetření.

Závěrečné hodnocení konfirmačních vyšetření může být:

- **negativní / nepotvrzen**- pokud se confirmací přítomnost markerů infekce vyloučí / nepotvrdí
- **pozitivní**- pokud se confirmací přítomnost markerů infekce potvrdí
- **nejasný / indeterminate**- pokud se přítomnost markerů infekce konfirmačním vyšetřením nepodaří ani vyloučit ani potvrdit

Jako „opakovaně nespecificky reaktivní“ se označí vzorek / dárce, u něhož je screening opakovaně reaktivní z různých odběrů provedených v odstupu alespoň

6 měsíců nebo v intervalu doporučeném NRL nebo po dobu 2 let a výsledky konfirmačních vyšetření v NRL jsou opakovaně negativní. (38)

3.4.4.1 Konfirmace negativní

Dárce je možné zařadit zpět do registru dárců a s odstupem minimálně šesti měsíců jej lze pozvat na odběr krve. Na základě vyhodnocení předběžného look-back lze uvolnit transfuzní přípravky z rizikových odběrů, případně informovat odběratele daných transfuzních přípravků nebo zpracovatele plazmy. (26)

3.4.4.2 Konfirmace pozitivní

U dárce se doporučuje provést odběr kontrolního vzorku krve, který se bez ohledu na výsledek screeningového vyšetření zašle do NRL. Z Transfuzního oddělení Nemocnice ČB a.s. se dárci předávají rovnou na infekční oddělení nemocnice. Dárce se označí jako pozitivní a trvale se vyřadí z dárcovství v regionálním i národním registru. Všechny transfuzní přípravky z rizikových odběrů se zlikvidují nebo předají k využití NRL. Informují se případní odběratelé daných transfuzních přípravků či zpracovatelé plazmy. (26)

3.4.4.3 Konfirmace nejasná

Dárce se dočasně vyřadí z odběrů, po minimálně šesti měsících (dle doporučení NRL) se dárce pozve na odběr kontrolního vzorku ke screeningovému i konfirmačnímu vyšetření, konfirmace se provede vždy, bez ohledu na výsledek screeningového vyšetření.

- Opakovaná konfirmace pozitivní- dárce se trvale vyřadí v registru dárců i v národním registru a pošle se na infekční oddělení k dalšímu vyšetření. Je nutné dárce vhodně informovat o důvodu jeho vyřazení.
- Opakovaná konfirmace nejasná- dárce se vyřadí, jeho zařazení zpět do registru je možné pokud jsou výsledky opakovaného vyšetření provedeného nejméně v odstupu 2 let negativní a to jak screeningového tak konfirmačního vyšetření.
- Opakovaná konfirmace negativní, bylo-li:

- screeningové vyšetření negativní- dárce se zařadí zpět do registru
- screeningové vyšetření opakovaně reaktivní, dárce se vyřadí v místním registru a hodnotí se jako opakovaně nespecificky reaktivní, další odběry se doporučují až po změně vyšetřovacího systému

Vyhodnotí se look-back, transfuzní přípravky z rizikových odběrů se likvidují. Informují se další odběratelé daných transfuzních přípravků nebo zpracovatelé plazmy.(26, 38)

3.4.5 Vyřazení dárce

- a) Dočasné vyřazení- opakovaná reaktivita screeningového vyšetření, do výsledku potvrzení
- b) Podmínečné vyřazení- v případě opakované reaktivity screeningových testů provedených z odběrů v odstupu alespoň 6 měsíců při opakovaně negativních výsledcích konfirmačního vyšetření
- c) Trvalé vyřazení s možností re-entry- nejasný výsledek konfirmačního vyšetření
- d) Trvalé vyřazení- pozitivita konfirmačního vyšetření

Trvale se vyřazuje i dárce, u kterého byla hlášena NAT („nucleic acid test“) pozitivita vyšetření HIV, HBV, HCV zpracovatelem plazmy, byla hlášena infekce HIV, HBV nebo HCV jiným subjektem, např. orgány ochrany veřejného zdraví, bylo opakovaně (>2x) vysloveno podezření na přenos potransfuzní hepatitidy (i když je laboratorní nález od těchto osob negativní). (26, 38)

4 Výsledky

4.1 Počet dárců

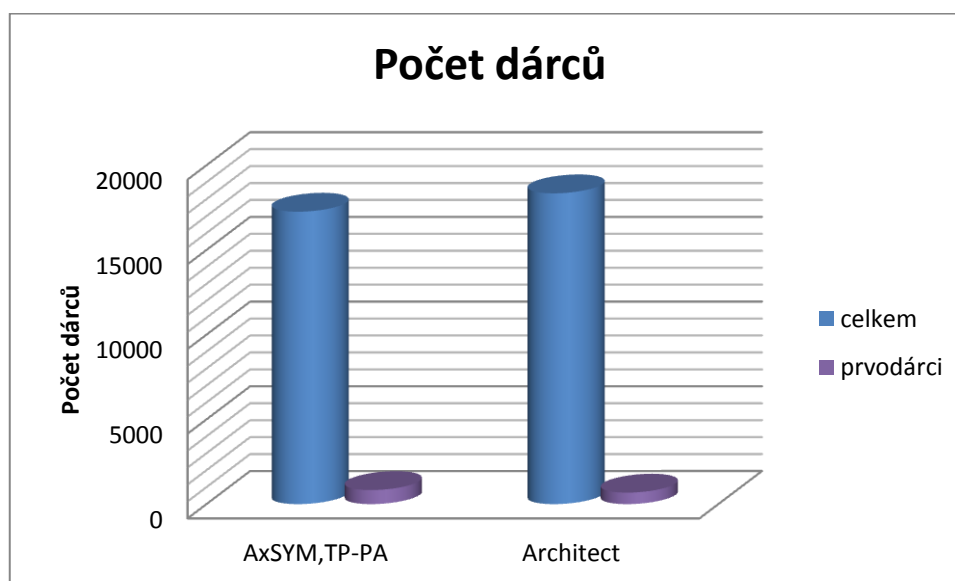
Tabulka č. 2: Počet dárců vyšetřených v období 1. 1. 2011 až 31. 1. 2013

Zdroj: vlastní výzkum

Metodika	Počet dárců	
	celkem	prvodárci
AxSYM, TP-PA	17262	830
Architect	18346	679

Graf č. 1: Počet dárců vyšetřených v období 1. 1. 2011 až 31. 1. 2013

Zdroj: vlastní výzkum



4.2 Počet reaktivních výsledků

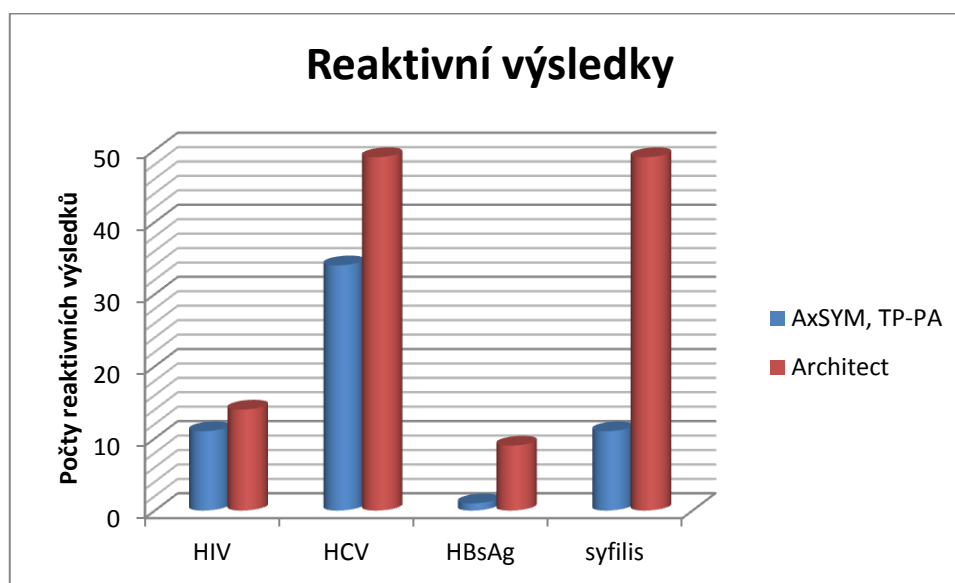
Tabulka č. 3: Počet reaktivních výsledků

Zdroj: vlastní výzkum

Metodika	Počet reaktivních výsledků				
	HIV	HCV	HBsAg	syfilis	celkem
AxSYM, TP-PA	11	34	1	11	57
Architect	14	49	9	49	121

Graf č. 2: Počet reaktivních výsledků

Zdroj: vlastní výzkum



Rozdělení na prvodárce a dárce pravidelné je důležité z hlediska určení rizikovější skupiny, za kterou se všeobecně považují noví dárce. Jako kontrolní vzorky jsou označené odběry od dárců, kteří již byli v minulosti označeni jako reaktivní a jejich konfirmační vyšetření mělo nejasný nebo pozitivní výsledek. Byli tedy opakovaně (kontrolně) zasláni do NRL. Jako reaktivní výsledky jsou zde započítány pouze ty, u nichž vyšlo screeningové vyšetření opakovaně reaktivní nebo hraniční. Protože pouze tyto byly odeslány do NRL ke konfirmačnímu vyšetření.

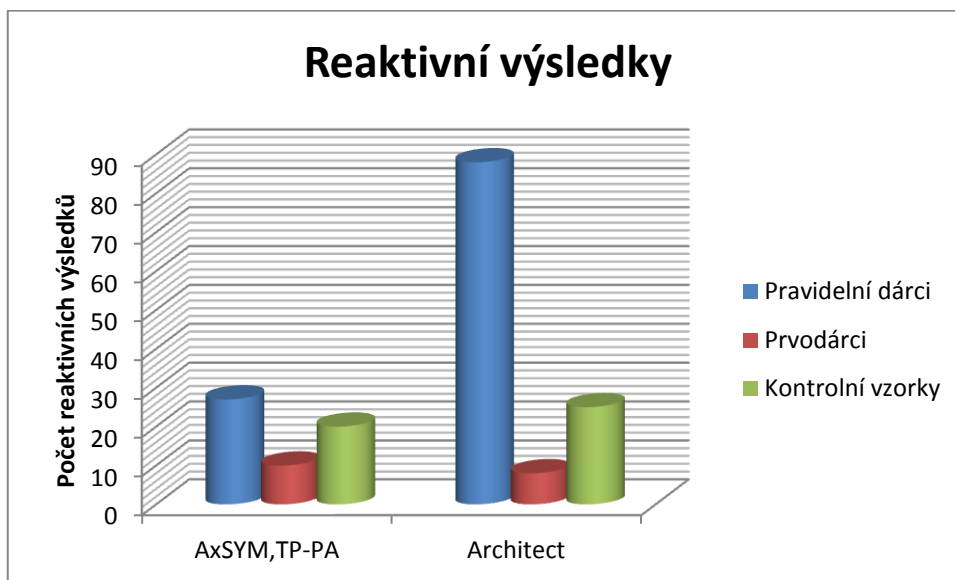
Tabulka č. 4: Počet reaktivních výsledků

Zdroj: vlastní výzkum

Metodika	Reaktivní výsledky						
	Metoda	Pravidelní dárce		Prvodárci		Kontrolní vzorky	
		Celkem	Ženy	Celkem	Ženy	Celkem	Ženy
AxSYM, TP-PA	HIV	3	1	1	1	7	1
	HCV	19	7	6	4	7	4
	HBsAg	0	0	1	1	0	0
	syfilis	5	3	2	0	6	4
	Součet	27	11	10	6	20	9
Architect	HIV ARC	10	4	1	0	3	1
	HCV ARC	29	8	5	1	15	4
	HBsAg ARC	7	2	0	0	2	1
	syfilis ARC	42	9	2	0	5	1
	Součet	88	23	8	1	25	7

Graf č. 3: Počet reaktivních výsledků

Zdroj: vlastní výzkum



Graf č. 4: Počet reaktivních výsledků s ohledem na jednotlivé metody

Zdroj: vlastní výzkum



4.3 Výsledky konfirmačního vyšetření

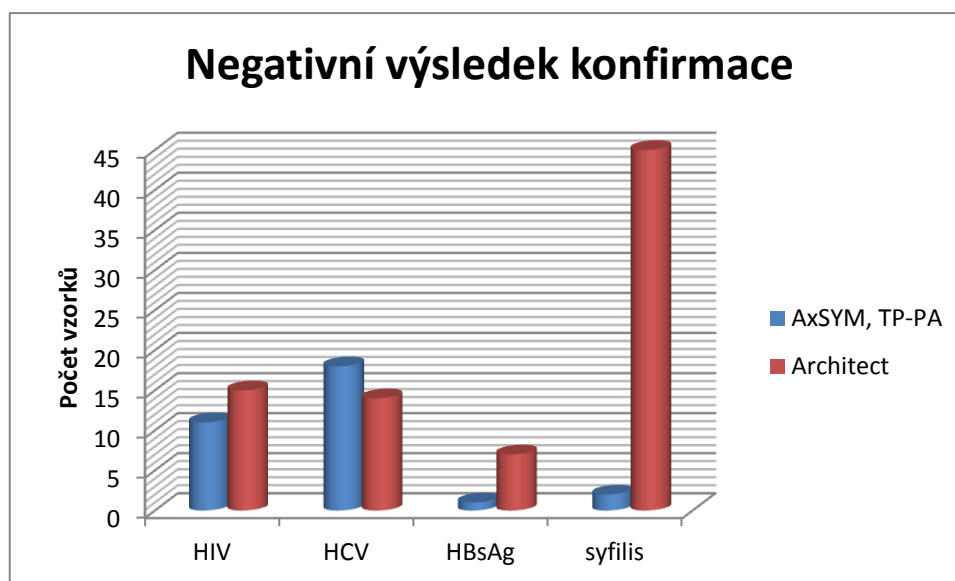
Tabulka č. 5: Přehled vzorků vyšetřených v NRL

Zdroj: vlastní výzkum

Metoda	Výsledky v NRL					
	AxSYM, TP-PA			Architect		
	Negativní	Nejasný	Pozitivní	Negativní	Nejasný	Pozitivní
HIV	11	0	0	15	0	0
HCV	18	13	1	13	33	0
HBsAg	1	0	0	7	2	1
syfilis	2	9	2	45	4	1
Součet	32	22	3	81	39	2

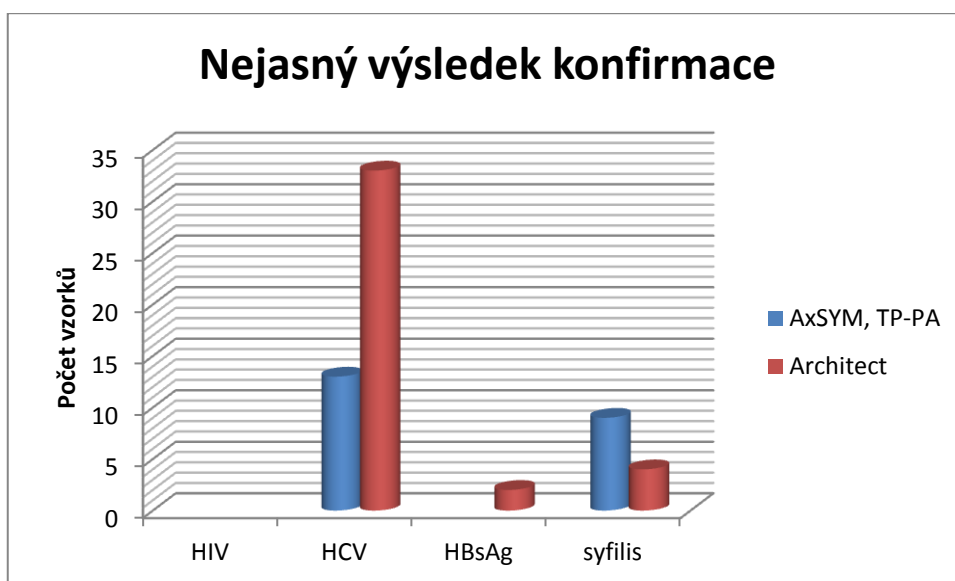
Graf č. 5: Negativní výsledek konfirmace

Zdroj: vlastní výzkum



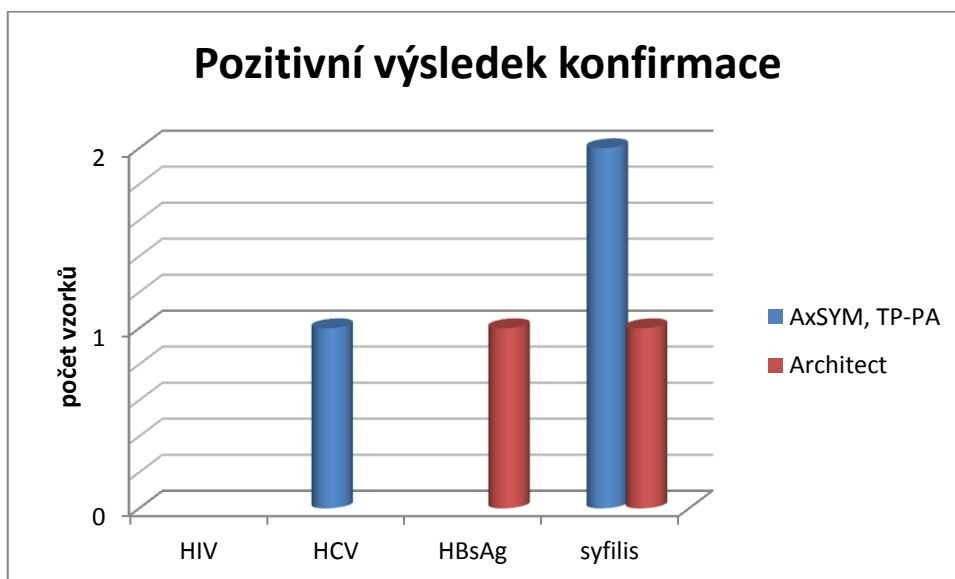
Graf č. 6: Nejasný výsledek confirmace

Zdroj: vlastní výzkum



Graf č. 7: Pozitivní výsledek confirmace

Zdroj: vlastní výzkum



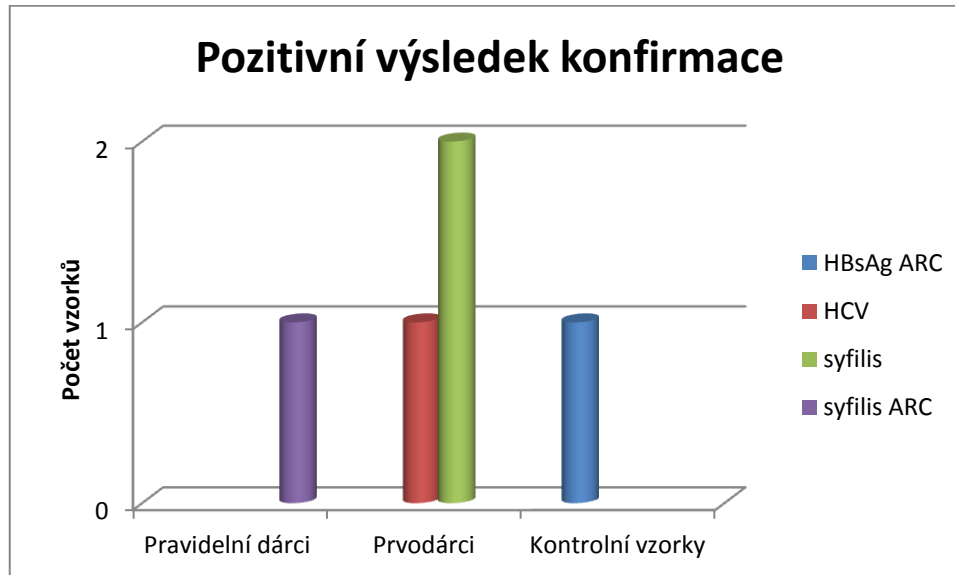
Tabulka č. 6: Pozitivní výsledek konfirmace u jednotlivých skupin

Zdroj: vlastní výzkum

Pozitivní výsledek v NRL							
Metodika	Metoda	Pravidelní dárči		Prvodárči		Kontrolní vzorky	
		Odeslané vzorky	Pozitivní v NRL	Odeslané vzorky	Pozitivní v NRL	Odeslané vzorky	Pozitivní v NRL
AxSYM, TP-PA	HIV	3	0	1	0	7	0
	HCV	19	0	6	1	7	0
	HBsAg	0	0	1	0	0	0
	syfilis	5	0	2	2	6	0
	Součet	27	0	10	0	20	0
Architect	HIV	10	0	1	0	3	0
	HCV	29	0	5	0	15	0
	HBsAg	7	0	0	0	2	0
	syfilis	42	1	2	0	5	1
	Součet	88	0	8	0	25	0

Graf č. 8: Pozitivní výsledek konfirmace

Zdroj: vlastní výzkum



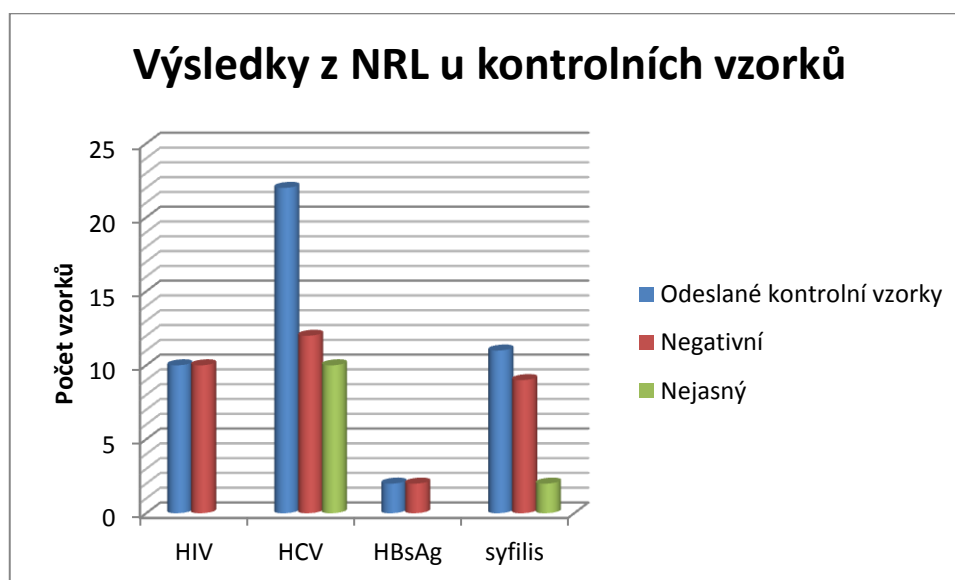
Tabulka č. 7: Celkové výsledky konfirmačních vyšetření u kontrolních vzorků

Zdroj: vlastní výzkum

Metoda	Odeslané kontrolní vzorky	Výsledky NRL	
		Negativní	Nejasný
HIV	10	10	0
HCV	22	12	10
HBsAg	2	2	0
syfilis	11	9	2
Součet	45	33	12

Graf č. 9: Výsledky konfirmačních vyšetření u kontrolních vzorků

Zdroj: vlastní výzkum



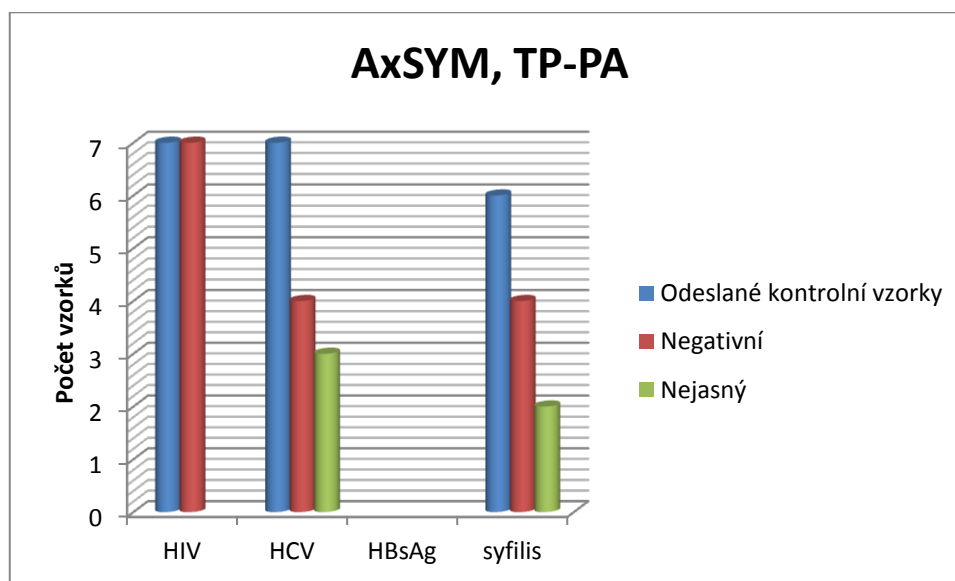
Tabulka č. 8: Výsledky konfirmačních vyšetření u kontrolních vzorků, jednotlivé analyzátory

Zdroj: vlastní výzkum

Metoda	Odeslané kontrolní vzorky		Výsledky NRL			
	AxSYM, TP-PA	Architect	AxSYM, TP-PA		Architect	
	-----	----	Negativní	Nejasný	Negativní	Nejasný
HIV	7	3	7	0	3	0
HCV	7	15	4	3	8	7
HBsAg	0	2	0	0	0	1
syfilis	6	5	4	2	5	0
Součet	20	25	15	5	18	7

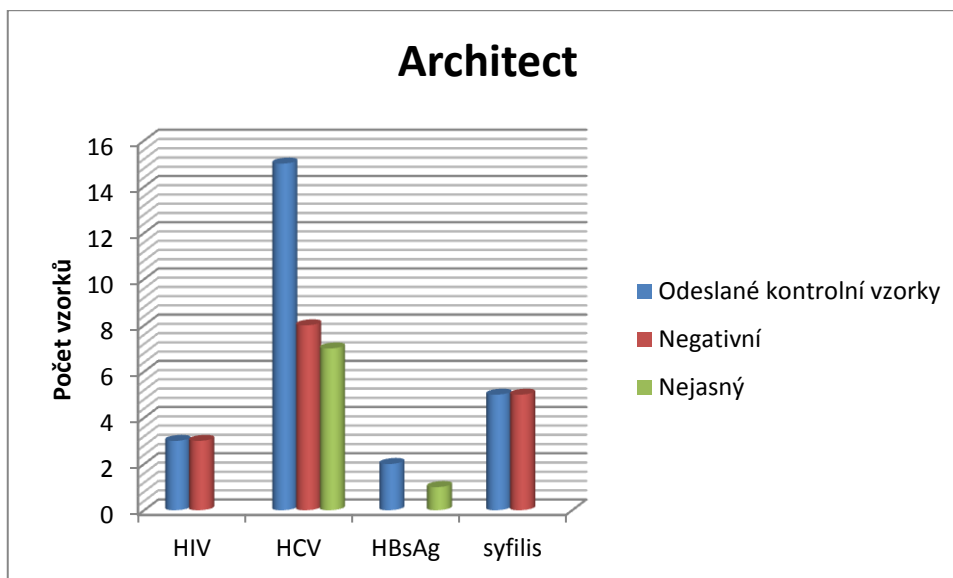
Graf č. 10: Výsledky konfirmačních vyšetření u kontrolních vzorků- AxSYM, TP-PA

Zdroj: vlastní výzkum



Graf č. 11: Výsledky konfirmačních vyšetření u kontrolních vzorků- Architect

Zdroj: vlastní výzkum



Tabulka č. 9: Pozitivní vzorky v NRL

Zdroj: vlastní výzkum

	Vzorky		Procentuelní vyjádření	
	odeslané	pozitivní	z odeslaných	z celk. počtu
AxSYM, Serodia	57	3	5,26%	0,017%
Architect	121	2	1,65%	0,011%

4.4 Diagnostická specifičnost

Diagnostická specifičnost je definována jako podíl počtu zdravých osob s negativním testem a celkového počtu testovaných zdravých jedinců.

$$\text{Výpočet: diagnostická specifičnost} = \frac{\text{správně negativní}}{\text{všichni zdraví}}$$

(všichni zdraví= správně negativní výsledky + falešně pozitivní výsledky)

(38)

Tabulka č. 10: Diagnostická specifičnost

Zdroj: vlastní výzkum, příbalové letáky (31, 34)

Diagnostická specifičnost			
Metodika	Metoda	Vypočítaná dg. specifičnost	Dg. specifičnost uvedená výrobcem
AxSYM, TP-PA	HIV	99,94%	99,87%
	HCV	99,80%	99,84%
	HBsAg	99,99%	99,95%
	syfilis	99,94%	100%
Architect	HIV	99,44%	99,89%
	HCV	99,25%	99,60%
	HBsAg	99,46%	99,91%
	syfilis	99,25%	99,78%

Vzhledem k neznalosti úplných parametrů, které použil k výpočtu výrobce, nelze oba soubory porovnat z hlediska statistické významnosti.

5 Diskuze

Tato práce se zabývala retrospektivním porovnáním různých vyšetřovacích systémů pro vyšetření infekčních markerů u dárců krve. Důraz byl kladen na počet reaktivních výsledků, jejich následné výsledky konfirmace z NRL. Ve skupině reaktivních a pozitivních výsledků s ohledem na počet prvodárců. V období od 1. 1. 2011 až 31. 1. 2011 bylo na analyzátoru AxSYM vyšetřeno 17262 dárců krve na infekce HIV, HBsAg a HCV, stejný počet vyšetření byl proveden i metodou TPPA pro diagnostiku onemocnění syfilis. V období od 1. 2. 2012 do 31. 1. 2013 bylo na analyzátoru Architect vyšetřeno 18346 vzorků od dárců krve na infekce HIV, HBsAg, HCV a syfilis. Počet vyšetření provedených analyzátozem Architect je tedy vyšší o 1084 vyšetření, počet nových dárců oproti tomu poklesl z 830 vyšetřených analyzátozem AxSYM a TP-PA na 679 vyšetřených metodou Architect.

Z celkového počtu vyšetření provedených analyzátozem AxSYM a diagnostickou soupravou TP-PA bylo za rok 2011 reaktivních 57 vzorků. S příchodem analyzátoru Architect se počty reaktivních vzorků zvýšily více než dvojnásobně na 121 vzorků. Jejich rozdělení na jednotlivé metody je uvedeno v tabulce č. 4 a grafy č. 3, 4. U všech metod je patrné zvýšení počtu reaktivních vzorků s nástupem analyzátoru Architect. Takto výrazné zvýšení počtu reaktivních výsledků je zapříčiněno vyšší senzitivitou použitých screeningových testů. Největší nárůst je patrný u vyšetřování protilátek proti *Treponema pallidum*, kterých bylo do NRL odesláno 49 ke konfirmačnímu vyšetření, stejný počet reaktivních vzorků byl i u vyšetření protilátek anti-HCV. Tato vyšetření se opírají o průkaz protilátek, z tohoto důvodu je možné usuzovat, že falešně pozitivní reaktivitu nám mohou v některých případech dávat i jiné nespecifické protilátky.

V tabulce č. 6, jsem uvedla rozdělení reaktivních výsledků do kategorií pravidelní dárce, prvodárce a vzorky kontrolní. V období vyšetřování vzorků systémem AxSYM a metodou TP-PA byly počty reaktivních vzorků u kontrolních vzorků 20, u prvodárců 10 a pravidelných dárců 27. Po přechodu na systém Architect vzrostly počty reaktivních vzorků oproti očekávání nejvíce u pravidelných dárců a to na 88 vzorků za sledované období, počet u prvodárců byl 8 vzorků (vzhledem k menšímu souboru vyšetřených

prvodárců, nedošlo k výraznému navýšení nebo snížení počtu reaktivních vzorků) a reaktivních kontrolních vzorků bylo 25. Nárůst reaktivních vzorků u pravidelných dárců byl, jak již je výše uvedeno, nejvýraznější u vyšetření protilátek anti-HCV a hlavně anti-TP. Předpokládá se, že počet reaktivních výsledků u pravidelných dárců nebude mít v následujících obdobích stoupající tendenci. Naopak po vyřazení všech stávajících dárců, u nichž předpokládáme interferující protilátky, počet falešných reaktivit u pravidelných dárců poklesne.

Výsledky konfirmačních vyšetření uvádí tabulka č. 5, nejvíce nejasných výsledků z NRL bylo u metody anti-HCV. Rozdělení na jednotlivé skupiny je patrné z tabulky č. 6. U nových dárců se infekce HCV potvrdila v 1 případě z 6 odeslaných, reaktivních na přístroji AxSYM. Infekce syfilis byla u nových dárců potvrzena ve 2 případech z 2 reaktivních metodou TP-PA a odeslaných do NRL. V jednom případě byla potvrzena infekce syfilis u opakované dárcyně, zachycena přístrojem Architect, zde se jednalo o latentní infekci. Infekce HBV byla potvrzena u 1 kontrolního vzorku, jehož předchozí konfirmace jako prvodárce byla nejasná a byl z NRL vyžádán nový vzorek. I když ve výzkumu šlo o malá čísla, největší záchyt pozitivních vzorků se projevil dle očekávání u prvodárců.

Procento pozitivních vzorků bylo při vyšetřování analyzátozem AxSYM a metodou TP-PA 5,26% z odeslaných vzorků a analyzátozem Architect 1,65% z odeslaných vzorků.

Při výpočtu diagnostické specifčnosti vyšla ve většině případů nižší procentuelní hodnota, než je uváděna výrobcem. Tento rozdíl je možné zdůvodnit jinou velikostí souboru, který byl oproti výrobcem k dispozici. Nižší hodnoty diagnostické specifčnosti u analyzátozem Architect, než upřístroje AxSYM jsou prioritně dány vyšší citlivostí metod Architect. Dalším předpokladem je, že dárcovská základna byla před tímto výzkumem několik let prošetřována na analyzátozem AxSYM. Tudiž dárci vykazující nespecifické reakce byly, již z dárcovství vyřazeni. Analyzátozem Architect představuje nový princip vyšetřování a bude nějaký čas trvat, než se z dárcovské základny opět vyřadí reaktivní dárci. Zřetelně nižší hodnota diagnostické specifčnosti vyšla u metody pro diagnostiku onemocnění syfilis, což odpovídá i zkušenostem z jiných laboratořích.

Na základě všech porovnaných parametrů lze považovat oba analyzátory za vhodné pro vyšetření dárců krve s dostatečnou specifitou. Analyzátor AxSYM byl nahrazen novějším analyzátozem Architect především kvůli modernizaci přístrojového vybavení, lepší citlivosti metod, mezi další přednosti patří možnost vyšetřování většího počtu vzorků v jedné sérii a zkrácení času trvání analýzy. Technologie chemiluminiscenční analýzy je upřednostňována kvůli vysoké citlivosti, jednoduchosti a spolehlivosti.

6 Závěr

Výsledky práce potvrzují, že se zavedením nové metodiky vyšetřování infekčních markerů u dárců krve, stoupl počet falešně reaktivních výsledků. Při screeningovém vyšetření dárce krve je hlavní podmínkou, že nesmí uniknout žádný pozitivní výsledek. Z tohoto důvodu je neustále kladen důraz na výrobce analyzátorů, na zvyšování senzitivity používaných metod. Určitou daní za přechod k modernějšímu vyšetřovacímu systému pro ZTS, který by měl vést k bezpečnější hemoterapii, je ztráta části dárcovské základny, která pomocí nového vyšetřovacího systému vykazuje reaktivní výsledky nepotvrzené v NRL. Kontrolou senzitivity použitých metod je zpětná reakce od zpracovatelů transfuzních přípravků, kteří opětovně vyšetřují vzorky dárců krve. V krajním případě by se falešně negativní výsledek screeningového vyšetření odhalil až z hlášení o potransfuzní infekci.

Vyšší záchyt reaktivních výsledků jsem oproti očekávání zaznamenala u pravidelných dárců. U nichž byly ve většině případů předchozí výsledky analyzátozem AxSYM nebo metodou TP-PA opakovaně negativní.

Výsledky konfirmačního vyšetření u kontrolních vzorků jsou ve většině případů negativní, bez ohledu na to, z kterého analyzátoru byl jejich předchozí screening reaktivní.

Dohromady NRL potvrdila 5 pozitivních výsledků u sledovaných infekcí, z toho 4 u nových dárců, toto zjištění potvrzuje předpoklad, že s pravidelným dárcovstvím se zvyšuje bezpečnost krevní transfuze.

Bezpečnost krevní transfuze nelze nikdy zaručit stoprocentně. Správným výběrem dárce, vyšetřením jeho krve, motivací k pravidelnému dárcovství bez výhledu na finanční ohodnocení lze snížit riziko přenosu infekce darovanou krví.

7 Seznam použité literatury

1. TESAŘOVÁ, E. *Transfuzní lékařství a imunohematologie*. NCO NZO Brno, 2002, 112 s.
2. SAKALOVÁ, A., LIPŠIC T. a kol. *Hematológia a transfuziológia: Teória a cvičenia*. Vydavateľstvo Žilina: Osveta, 527 s. 1995 ISBN 80-217-0444-6
3. HRUBIŠKO, M. a kol. *Hematologie a krevní transfúze II, Krevní transfúze*. Praha: Avicenum 1983. 1. české vydání, 206. ISBN 08-056-83
4. KUBISZ, P. *Hematológia a transfuziológia: učebnica*. 1. vyd. Bratislava: Grada Slovakia, 2006, 323 s. ISBN 80-809-0000-0.
5. Vyhláška MZ ČR 143/2008 Sb. O stanovení bližších požadavků pro zajištění jakosti a bezpečnosti lidské krve a jejich složek (Vyhláška o lidské krvi) [online]. [cit. 2012-11-10]. Dostupné z: <http://www.transfuznispolecnost.cz/dokumenty.php>
6. Poučení pro dárce krve. [online]. [cit. 2012-12-15]. Dostupné z: <http://www.transfuznispolecnost.cz/dokumenty.php>
7. Dotazník dárce krve. Transfuzní oddělení Nemocnice České Budějovice a.s.
8. GÖPFERTO VÁ, D., PAZDIORA, P., DÁŇOVÁ, J. *Epidemiologie infekčních nemocí: učebnice pro lékařské fakulty (bakalářské a magisterské studium)*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2003, 230 s. ISBN 80-246-0452-3.
9. NAVRÁTIL, L. a kol. *Vnitřní lékařství*. Vydání první, Praha 2008, 424s. ISBN 978-80-247-2319-8.
10. ROZSY PAL, H. *AIDS: klinický obraz a léčba*. [1. vyd.]. Praha: MAXDORF-JESSENIUS, 1998, 236 s., barevná příloha. ISBN 8090286965.
11. VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, 495 s. ISBN 80-902-8966-5.
12. KRAMÁŘ, R. *Lékařská mikrobiologie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita Zdravotně sociální fakulta, 2007. ISBN 978-80-7394-021-8.
13. BEDNÁŘ, M. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vyd. Praha: Marvil, 1996, 558 s. 978-80-238-0297-9

14. SICKINGER, E., STIELER, M., KAUFMAN, B., KAPPRELL, H. P., WEST, D., SANDRIDGE, A., DEVARE, S., SCHOCHETMAN, G., HUNT, J. C., DAGHFAL, D. Multicenter evaluation of a new, automated enzyme-linked immunoassay for detection of human immunodeficiency virus-specific antibodies and antigen. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004-01-08, roč. 42, č. 1, s. 21-29. ISSN 0095-1137. DOI: 10.1128/JCM.42.1.21-29.2004. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.42.1.21-29.2004>
15. ESHLEMAN, S. H., KHAKI L., LAEYENDECKER, O., PIWOWAR-MANNING, E., JOHNSON-LEWIS, L. T., HUSNIK, M., KOBLIN, B., COATES, T., CHESNEY, M., VALLARI, A., DEVARE, S. G., HACKETT, J. Detection of individuals with acute HIV-1 infection using the ARCHITECT HIV Ag/Ab Combo assay. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2009, roč. 52, č. 1, s. 121-124. ISSN 1525-4135. DOI: 10.1097/QAI.0b013e3181ab61e1. Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage>
16. KIM, S., LEE, J. - H., CHOI, J. Y., KIM, J. M., KIM, H.-S.. False-positive rate of a "Fourth-generation" HIV antigen/antibody combination assay in an area of low HIV prevalence. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2010-09-30, roč. 17, č. 10, s. 1642-1644. ISSN 1556-6811. DOI: 10.1128/CVI.00258-10. Dostupné z: <http://cdli.asm.org/cgi/doi/10.1128/CVI.00258-10>
17. PANDORI, M. W., HACKETT, J., LOUIE, B., VALLARI, A., DOWLING, T., LISKA, S., KLAUSNER, J. D. Assessment of the ability of a Fourth-generation immunoassay for human immunodeficiency virus (HIV) antibody and p24 antigen to detect both acute and recent HIV infections in a high-risk setting. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009-07-30, roč. 47, č. 8, s. 2639-2642. ISSN 0095-1137. DOI: 10.1128/JCM.00119-09. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00119-09>
18. LUKÁŠ, K., ŽÁK, A. *Gastroenterologie a hepatologie: učebnice*. 1. vyd. Praha: Grada, 2007, 380 s. ISBN 978-802-4717-876.
19. KREKULOVÁ, L., ŘEHÁK, V. *Virové hepatitidy: prevence, diagnostika a léčba virových hepatitid v první linii*. Praha: Triton, 1998, 59 s. ISBN 80-858-7592-6.

20. NIEDERHAUSER, Ch. Reducing the risk of hepatitis B virus transfusion-transmitted infection. *Journal of Blood Medicine*. 2011-07-11, s. 91-102. ISSN 1179-2736. DOI: 10.2147/JBM.S12899. Dostupné z: <http://www.dovepress.com/reducing-the-risk-of-hepatitis-b-virus-transfusion-transmitted-infecti-peer-reviewed-article-JBM>
21. HADZIYANNIS, E., MANESIS, E., VASSILOPOULOS, D., GEORGIU, A., ARCHIMANDRITIS, A. Performance characteristics of microparticle enzyme and chemiluminescence immunoassays for measurement of anti-HBc immunoglobulin M in sera of patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2008-02-01, roč. 15, č. 2, s. 385-387. ISSN 1556-6811. DOI: 10.1128/CVI.00414-07. Dostupné z: <http://cdli.asm.org/cgi/doi/10.1128/CVI.00414-07>
22. ALZAHIRANI, A. J., OBEID, O. E. Detection of hepatitis C virus core antigen in blood donors using a new enzyme immunoassay. *Journal Family Community Medicine*. roč. 11, s. 103-107, 2004 září-prosinec. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3410079/>
23. KESLI, R., POLAT, H., TERZI, Y., KURTOGLU, M. G., UYAR, Y. Comparison of a newly developed automated and quantitative hepatitis C Virus (HCV) core antigen test with the HCV RNA assay for clinical usefulness in confirming anti-HCV results. DOI: 10.1128/JCM.05292-11. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.05292-11>
24. PODSTATOVÁ, H. *Mikrobiologie. Epidemiologie. Hygiena: učebnice pro zdravotnické školy a bakalářské studium*. 1. vyd. Olomouc: Epava, 2001, 283 s. ISBN 80-862-9707-1.
25. MAPLE, P. A. C., RATCLIFFE, D., SMIT, E. Characterization of *Treponema pallidum* particle agglutination assay-negative sera following screening by *Treponemal total antibody enzyme immunoassays*. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2010-11-01, roč. 17, č. 11, s. 1718-1722. ISSN 1556-6811. DOI: 10.1128/CVI.00102-10. Dostupné z: <http://cdli.asm.org/cgi/doi/10.1128/CVI.00102-10>

26. Doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2009_05. [online]. 15. 5. 2009 [cit. 2012-12-20]. Dostupné z: <http://www.transfuznispolecnost.cz/dokumenty.php>
27. Standardní operační postup. Úsek A: Dárci krve. Transfuzní oddělení Nemocnice Č. B., a. s.
28. Standardní operační postup. Úsek C: Analytika dárců krve (SOP C/6 verze 14, C/7 verze 12, C/8 verze 12, C/9 verze 12, Obsluha analyzátoru Axsym C/11 verze 2). Transfuzní oddělení Nemocnice Č. B., a. s. (s platností pro analyzátor AxSYM a dg. Soupravu Serodia do 31. 1. 2012)
29. Standardní operační postup. Úsek C: Analytika dárců krve (SOP C/6 verze 15, C/7 verze 13, C/8 verze 13, C/9 verze 13, Obsluha analyzátoru Architect C/10 verze 3). Transfuzní oddělení Nemocnice Č. B. a. s. (s platností pro analyzátor Architect)
30. Uživatelská příručka AxSYM firmy Abbott
31. Příbalové letáky k diagnostikům pro systém AxSYM. [online]. [cit. 2012-12-20].
32. Příbalový leták firmy Serodia
33. Uživatelská příručka Abbott Architect
34. Příbalové letáky k diagnostikům pro systém Architect. [online]. [cit. 2012-12-20].
35. RACEK, J. *Klinická biochemie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Galén, 2006, 329 s. ISBN 80-726-2324-9.
36. ŽAMPACHOVÁ, E. Interpretace sérologického výsledku. [online]. [cit. 2012.08.28]. Dostupné z: <http://www.lf2.cuni.cz/info2lf/ustavy/ulm/serol.htm>
37. DASTYCH, M., BREINEK, P. *Klinická biochemie: bakalářský obor Zdravotní laborant*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2008, 232 s. ISBN 978-802-1045-729.
38. Směrnice Transfuzního oddělení. Transfuzní oddělení Nemocnice Č. B., a. s. Postup při záchytu reaktivních výsledků vyšetření infekčních markerů krve a krevních složek, verze 2

8 Klíčová slova

infekční markery

AxSYM

Architect

TP-PA

reaktivní výsledky

konfirmační vyšetření

prvodárci

specifičnost

senzitivita

9 Přílohy

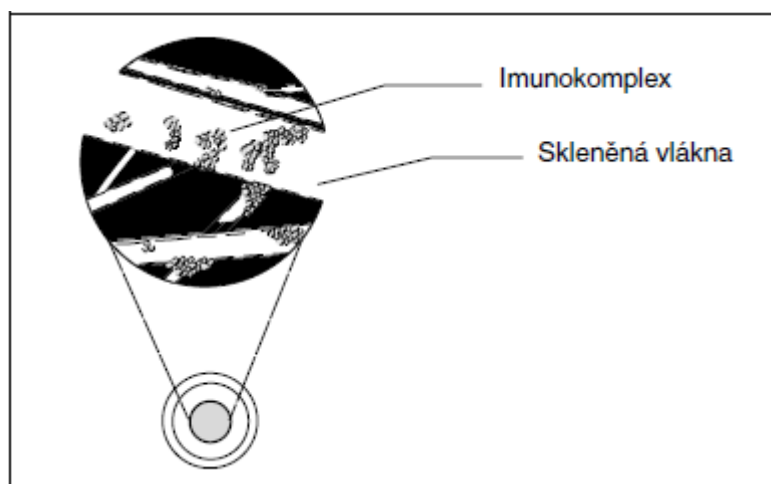
Příloha 1: Analyzátor AxSYM

Zdroj: společnost Abbott Diagnostic Česká Republika, [online] dostupné z <http://www.abbottdiagnostics.cz/Katalog-produktu/Platformy/Imunoanalyza/AxSYM/5-7-q9-14.instrument.aspx>



Příloha 2: Vazba imunokomplexu na skleněná vlákna

Zdroj: Uživatelská příručka AxSYM firmy Abbott



Příloha 3: Analyzátor Architect

Zdroj: společnost Abbott Diagnostic Česká Republika, [online] dostupné z <http://www.abbottdiagnostics.cz/Katalog-produktu/Platformy/Imunoanalyza/ARCHITECT-i2000-i2000SR/5-7-q9-h.instrument.aspx>



Příloha 4: Dvou kroková analýza testů firmy Abbott

Zdroj: materiály společnosti Abbott Diagnostic Česká Republika

