



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Laboratorní diagnostika hepatitidy typu B

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní obor: **ZDRAVOTNÍ LABORANT**

Autor: Denisa Janů

Vedoucí práce: MUDr. Kateřina Mlčochová

České Budějovice 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Laboratorní diagnostika hepatitidy typu B*“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů 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 elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích 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 bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....
Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce MUDr. Kateřině Mlčochové za odborné vedení mé bakalářské práce, její ochotu, vstřícnost, pečlivost a čas, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat všem kolegyním a kolegovi z laboratoře Vidia diagnostika, kteří mi během studia vždy vyšli vstříc s velkou snahou a trpělivostí.

Laboratorní diagnostika hepatitidy typu B

Abstrakt

Hepatitida typu B je zánětlivé virové onemocnění jater. Původcem onemocnění je DNA virus z čeledi Hepadnaviridae. Přenáší se krví a sekrety infikovaného člověka. Největší nebezpečí onemocnění spočívá v přechodu do chronicity. Chronická infekce s sebou nese vysoké riziko rozvoje jaterní cirhózy a hepatocelulárního karcinomu. Onemocnění hepatitidou B je rozšířeno po celém světě. Nejspolehlivější prevencí je očkování a vyvarování se rizikovému chování a kontaktu s osobami s rizikovým chováním, zejména uživateli drog a promiskuitními osobami. Cílem této bakalářské práce je seznámení s problematikou onemocnění virové hepatitidy typu B a popis současných možností diagnostiky markerů hepatitidy B pomocí přístroje COBAS e601 firmy ROCHE metodou elektrochemiluminiscenční imunoanalýzy a kvantifikace HBV DNA na přístroji COBAS 4800 firmy ROCHE metodou real time PCR a vyhodnocování výsledků při použití obou metod. Soubor vyšetřovaných vzorků pochází z laboratoře infekční sérologie a virologie společnosti VIDIA-DIAGNOSTIKA. Výsledky práce ukazují, že HBsAg je nejvíce vyšetřovaným markerem hepatitidy B. Pozitivní nálezy tvoří pouze 0,67 %. Poměr HBsAg pozitivních mužů a žen za rok 2019 byl téměř vyrovnaný. Nejvíce HBsAg pozitivních pacientů bylo ve věku 30-40 let. Dále jsem zkoumala prevalenci anti-HBc Ig total protilátek. Pozitivita anti-HBc Ig total se potvrdila v 4,27 % vyšetření. Poměr anti-HBc Ig total pozitivních mužů a žen za rok 2019 byl také téměř vyrovnaný a nejvíce pozitivních bylo ve věku 30-40 let.

Klíčová slova

Virus hepatitidy B; hepatitida B; hepadnaviridae; elektrochemiluminiscenční imunoanalýza; real time PCR; australský antigen; sérologie; markery hepatitidy B

Laboratory diagnostics of hepatitis B

Abstract

Hepatitis B is an inflammatory viral disease of the liver. The etiological agent is a DNA virus from the Hepadnaviridae family. It is transmitted through the blood and secretions of an infected person. The greatest danger of the disease lies in the transition to chronicity. Chronic infection carries a high risk of developing liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Hepatitis B is widespread throughout the world. The most reliable prevention is vaccination and avoidance of risky behavior and contact with persons with risky behavior, especially drug users and promiscuous persons. The aim of this bachelor thesis is to get acquainted with the disease of viral hepatitis B and to describe the current possibilities of diagnostics of hepatitis B markers using the COBAS e601 device from ROCHE by electrochemiluminescent immunoassay and quantification of viral DNA on the COBAS 4800 from ROCHE by real time PCR and evaluation of results using both methods. The set of examined samples comes from the laboratory of infectious serology and virology of the company VIDIA-DIAGNOSTIKA. The results show that HBsAg is the most investigated marker of hepatitis B. Positive findings make up only 0.67%. The ratio of HBsAg positive men and women in 2019 was almost balanced. Most HBsAg positive patients were aged 30-40 years. I also examined the prevalence of anti-HBc Ig total antibodies. The positivity of anti-HBc Ig total was confirmed in 4.27% of examinations. The ratio of anti-HBc Ig total positive men and women in 2019 was also almost balanced and the most positive were at the age of 30-40 years.

Key words

Hepatitis B virus; hepatitis B; hepadnaviridae; electrochemiluminescent immunoassay; real time PCR; australian antigen; serology; hepatitis B markers

1. Úvod	8
2. Hepatitida typu B	9
2.1 Virus hepatitidy typu B	9
2.1.1 Historie	9
2.1.2 Taxonomie	9
2.1.3 Stavba virové částice	10
2.1.4 Životní cyklus.....	12
2.1.5 Mutanty HBV.....	13
2.1.6 Imunitní odpověď pacienta.....	13
2.1.7 Očkování.....	14
2.2 Stádia infekce HBV.....	15
2.2.1 Akutní hepatitida B.....	15
2.2.2 Chronická hepatitida B.....	16
2.2.3 Komplikace chronické hepatitidy	18
2.3 Laboratorní diagnostika	19
2.3.1 Sérologické markery.....	19
2.3.2 Biochemické markery	20
2.3.3 Molekulární diagnostika.....	21
2.3.4 Histologická diagnostika	21
2.4 Léčba.....	22
3. Cíl práce a hypotézy	23
4. Metodika	24
4.1 Preanalytická příprava.....	24
4.2 Stanovení markerů hepatitidy metodou ECLIA.....	25
4.2.1 Princip metody.....	25
4.2.2 cobas® e601	27
4.2.3 HBsAg konfirmace.....	29

4.2.4	<i>Hodnocení výsledků</i>	29
4.3	Kvantifikace DNA HBV pomocí real-time PCR.....	31
4.3.1	<i>Izolace a purifikace DNA</i>	32
4.3.2	<i>Amplifikace DNA</i>	33
4.3.3	<i>Hodnocení výsledků</i>	34
5.	Výsledky	36
5.1	Sérologické markery	36
5.2	HBV DNA.....	43
6.	Diskuze	45
7.	Závěr	47
8.	Seznam citované literatury	48
9.	Seznam obrázků a tabulek	51
10.	Seznam zkratk	52

1. Úvod

Hepatitida typu B je jedno z nejzávažnějších virových onemocnění postihující játra. Díky povinnému očkování sice dochází k jejímu poklesu, ale pro svůj parenterální přenos je její výskyt častější mezi rizikovými skupinami lidí. Nejméně 50 % infekcí u dospělých proběhne asymptomaticky či bez ikteru, u dětí jsou inaparentní průběhy ještě častější kvůli nezralosti imunitního systému. Nebezpečí onemocnění spočívá hlavně v riziku přechodu do chronicity, která během let může způsobit cirhózu jater až hepatocelulární karcinom.

Z oficiálních dat WHO riziko přechodu infekce do chronicity u jinak zdravého člověka nakaženého v dospělosti je asi 5 %. Ovšem u dětí díky nezralosti imunitního systému je riziko značně vyšší a to 80–90 % u dětí nakažených do 1 roku věku a 30–50 % u dětí nakažených do 6 let věku. U 20–30 % chronicky nemocných se rozvine cirhóza a/nebo rakovina jater. U 0,1–1% pacientů se vyvine fulminantní forma infekce. Je způsobena velmi silnou imunitní reakcí organismu vedoucí k masivnímu hepatocelulárnímu poškození, jaternímu kómatu a smrti. Během porodu je až 90% riziko nakažení novorozence, proto se vyšetření HBsAg (jako screeningového markeru) povinně provádí u všech těhotných žen. Všechny děti HBsAg pozitivních matek jsou očkovány proti hepatitidě B do 12 hodin po narození, dále je jim podána i pasivní imunizace (imunoglobulin proti hepatitidě B).

V klinických laboratořích se diagnostikují z patientských sér tzv. markery hepatitidy B. To jsou antigeny HBsAg a HBeAg a protilátky anti-HBs IgG, anti-HBe IgG, anti-HBc Ig total a anti-HBc IgM. V současnosti nejspolehlivějším průkazem aktivní infekce je detekce HBV DNA v séru metodou PCR. Stanovení markerů HBV v kombinaci se stanovením DNA HBV podá lékaři poměrně přesnou informaci o vztahu pacienta a hepatitidy B. Na základě tohoto vyšetření a vyšetření biochemických markerů je schopen vyhodnotit, zda pacient má akutní či chronickou aktivní infekci, nebo je pouze chronickým nosičem. Zda infekci někdy v životě prodělal, či se s ní nesetkal. Nyní v době povinného očkování proti hepatitidě B může také zjistit, zda pacient vyvinul dostatečnou ochrannou hladinu protilátek. Stanovení HBsAg je součástí předoperačního vyšetření, těhotenských vyšetření a také součástí vyšetření při asistované reprodukci podle zákona č. 296/2008 Sb.

2. Hepatitida typu B

2.1 *Virus hepatitidy typu B*

2.1.1 *Historie*

Onemocnění bylo dříve známé hlavně jako sérová žloutenka. Objevovalo se hlavně u pacientů trpících leukémií, kteří byli léčeni krevními transfúzemi. V roce 1964 Baruch S. Blumberg a Harvey J. Alter se spolupracovníky objevili tzv. australský antigen z krve australského Aborigince jako původce post-transfúzní žloutenky. Na základě tohoto objevu byl na podzim roku 1969 spuštěn screeningový program testování všech dárců krve. Frekvence výskytu post-transfúzní žloutenky se snížila na 6 %. Téhož roku započali Baruch Blumberg a Iving Millman výzkum vakcíny proti hepatitidě typu B. (Blumberg, 1977). Doktor Blumberg za tento objev získal v roce 1976 Nobelovu cenu.

Recentní studie však ukazují, že historie HBV sahá mnohem dál. Nejstarší HBV byl identifikován v DNA nakažených ptáků už v období druhohor. Lidský kmen HBV se vyvinul zhruba 33 600 let zpátky. (Suh et al., 2013)

2.1.2 *Taxonomie*

Podle Baltimorovy klasifikace virus hepatitidy typu B patří do VII. skupiny (ds-DNA viry s reverzní transkriptázou). Patří do čeledi Hepadnaviridae, která zahrnuje rody Orthohepadnaviry a Avihepadnaviry. Rod Avihepadnaviridae je fylogeneticky starší, pojímá viry izolované z pekingských kachen (DHBV), volavek (HHBV), hus bělostných (RGHV), jeřábů (CHBV), čápů (STHBV) a papoušků (PHBV). Mezi orthohepadnaviry se řadí viry izolované z afrických a asijských primátů. To je zejména lidský HBV, šimpanzí (ChHBV), gorilí (GoHBV), orangutaní (OuHBV), giboní (GiHBV) a HBV virus napadající chápány rodu *Lagothrix* (WMHBV). Dále mezi orthohepadnaviridae patří viry izolované z hlodavců, a to ze sviště (WHV), veverky (GSHV), polární veverky (ASHV) a barmských netopýrů (BtHV). Rozdílnost na úrovni nukleotidů lidského HBV s primátními kmeny činí jen zhruba 8 %, s kachním DHBV až 40 % a s hlodavčími kmeny se homologie pohybuje mezi 47-70 %. (Locarnini et al., 2013)

Všechny viry rodu Hepadnaviridae mají velice malý a kompaktní genom kódující překrývající se čtecí rámce (ORF). Všechny také využívají stejnou replikační strategii, během které virus replikuje svojí DNA reverzní transkripcí RNA intermediátu použitím virové polymerázy. Hepadnaviry se také liší od ostatních virů s reverzní transkripcí tím, že k jejich replikaci není potřebná integrace virové DNA do genomu hostitelské buňky.

Lidský HBV je rozdělen na 10 genotypů (A-J), které se od sebe liší z více než 8 % na úrovni nukleotidů. Každý genotyp má charakteristickou velikost genomu a geografickou distribuci. Genotyp A se vyskytuje v Africe, Asii, severní Evropě a severní Americe. Spolu s genotypem D je nejrozšířenější. Pro genotyp B je typická lokalizace v Japonsku, Indonésii, Číně, Vietnamu a Kambodži. Genotyp C je považován za nejstarší a jeho antigen HBsAg za nejpodobnější k primátím kmenům. Rozšířen je hlavně v jižním Pacifiku, jihovýchodní Asii a Severní Americe. Genotyp G byl nalezen v Evropě, Japonsku a USA. (Locarnini et al., 2013)

2.1.3 Stavba virové částice

Infekční virová částice HBV, tzv. Daneova částice, má tvar ikosahedru o velikosti 42-47 nm, patří mezi nejmenší virové částice. Skládá se z vnějšího lipoproteinového obalu s povrchovým antigenem HBsAg, nukleokapsidy a neúplné cirkulární DNA zvané rcDNA (relaxed circular DNA). Genom HBV obsahuje kolem 3200 nukleotidů, které jsou párové i nepárové. Replikace probíhá ve 4 otevřených čtecích rámcích (ORF), které se vzájemně překrývají. ORF P kóduje DNA polymerázu, je největší a po celé délce překrývá ORF S. Druhý největší, ORF S, kóduje obalový protein ve třech isoformách: povrchový antigen velký (L-HBsAg), střední (M-HBsAg) a malý (S-HBsAg). (Lamontagne et al., 2016) Současně kóduje geny domény pre-S1 a pre-S2, které kódují místo vazebného receptoru hepatocytu. ORF C kóduje geny virové kapsidy, obsahuje pre-core a core-region, dává vznik core antigenu HBcAg a envelope antigenu HBeAg. Nejmenší ORF X kóduje malý regulační protein HBX. (Stránský, 2001; Lamontagne et al., 2016)

Všechny 4 ORF leží na vlákně (-)DNA, které je kompletní a kódují mRNA pro proteiny HBc, HBe, HBs, HBX a polymerázu. Vlákně (+)DNA je inkompletní s fixovaným 5' koncem a variabilním 3' koncem. (Stránský, 2001)

Povrchové proteiny HBsAg jsou syntetizovány v ER hostitelské buňky. Jejich hlavní funkcí je tvořit obal virionu. Nejsou exprimovány rovnoměrně, nejvíce je exprimován S-HBsAg a tvoří tak většinu obalu. Na povrchu infekčních částic viru, Daneových částic, se nacházejí i další dvě formy povrchových proteinů, M-HBsAg a L-HBsAg. Infikované buňky produkují i neinfekční částice SVP (subviral particles), které se skládají hlavně z S-HBsAg. SVP jsou produkovány ve dvou formách: sférické částice o velikosti 25 nm obsahující pouze S-HBsAg a tubulární filamenta o velikosti 22 nm sestávající se hlavně z S-HBsAg, v menší míře obsahují i M-HBsAg a málo nebo žádný L-HBsAg. Takto volný neinfekční HBsAg se může v krvi infikovaného člověka objevovat až v 10 000krát vyšší koncentraci než infekční částice. (Bruss et al., 2004). Není přesně známo, proč HBV tvoří takové množství neinfekčních částic. Hovoří se o možnosti vychytávání protilátek, a tím uchránění co nejvíce infekčních částic od útoku imunitního systému a indukci imunitní tolerance potřebné k rozvoji chronické infekce. (Lamontagne et al., 2016)

Protein HBc je rozpustný dimer a tvoří core částice nukleokapsidy. Většina nukleokapsid izolovaných z Daneových částic má triangulační číslo 4 (číslo reprezentující velikost a složitost kapsidy, čím je číslo vyšší, tím větší a složitější strukturu kapsida má) a obsahuje 120 dimerů. Malé procento částic má T=3, tzn. 90 dimerů. Kromě kompletace obalu genomu se aktivně podílí na iniciaci reverzní transkripce. (Lamontagne et al., 2016) Na karboxylovém konci (C-terminus domain, CTD) obsahuje doménu bohatou na aminokyselinu arginin (arginin-rich domain, ARD). Fosforylací různých aminokyselin v této doméně probíhá regulace různých stádií životního cyklu viru. (Li et al., 2010) Lokalizace core proteinu v hepatocytech není stálá a koreluje se závažností průběhu infekce. Rychle a kontinuálně cestuje z cytoplazmy do jádra a zpět na základě signalizace a využívá k tomu proteiny hostitelské buňky (TAP protein). (Li et al., 2010)

Protein HBe je markerem probíhající replikace viru. Jeho přesná funkce zatím není více známá. V několika studiích se objevuje hypotéza, že HBeAg má imunoregulační funkci. (Lamontagne et al., 2016)

Protein X je jediným nestrukturálním proteinem viru. Plní regulační funkci při replikaci a transkripci. Zachovává přirozený transkripční templát, jadernou cccDNA, tak je virová DNA v transkripčně aktivním stavu, a tím je nepostradatelný k zahájení a udržení transkripce. (Lucifora et al., 2011) Kromě toho má transaktivační schopnosti, váže se na

tumor-supresorové geny, a tím indukuje maligní proliferaci. (Sherlocková a Doodley, 2004)

Virová DNA polymeráza je esenciální pro množení viru. Má dvě domény, první doména zahajuje enkapsidaci pgRNA a syntézu (-)ssDNA a druhá doména má funkci reverzní transkriptázy. (Votava, 2003)

2.1.4 Životní cyklus

Po vniknutí Daneovy částice do těla hostitele se virus připojí na hepatocyty. Bránou pro vstup do buňky je transmembránový protein NTCP (sodium-taurocholate co-transporting polypeptide), který v membráně hepatocytů běžně zprostředkovává přenos žlučových kyselin. Jeho role je klíčová i v životním cyklu HDV a HCV. (Eller et al., 2018). Pomocí clathrin-dependentní endocytózy se dostane do hepatocytu hostitele. (Huang et al., 2012) Mechanismus úniku z endocytického váčku zatím není znám. Uvnitř hostitelské buňky se virová rcDNA uvolní do jádra, kde je hostitelskými buněčnými enzymy přirozeně opravena a kovalentní vazbou spojena do cccDNA (covalently closed circular DNA). CccDNA tvoří templát pro syntézu šesti mRNA transkriptů (precore+core, preS, S+M, X) se čtyřmi oddělenými promotory (core, preS, S a X). Alternativně se rcDNA může konvertovat do dsDNA (double-stranded linear DNA) a integrovat se do hostitelského genomu. (Seeger et al., 2015) CccDNA se váže na histony a další nehistonové proteiny a spolu tvoří minichromozomy o velikosti 11 nm. Jedním z nehistonových proteinů je HBc (Bock et al., 2001). Dalším důležitým nehistonovým proteinem spojeným s HBV minichromozomy je HBx. (Belloni et al., 2009)

K transkripci cccDNA virus využívá hostitelskou RNA-polymerázu II. (Votava, 2003) Transkripty mRNA jsou transportovány z jádra k translaci. Výsledkem translace je protein HBc a virová polymeráza. PgRNA (pregenomic RNA) spolu s HBc proteinem a polymerázou vytvoří nezralou kapsidu, ve které probíhá reverzní transkripce pgRNA na (-)ssDNA, která je templátem pro syntézu (+)ssDNA. Dohromady spolu tyto řetězce vytvoří rcDNA. (Li, 2010)

V počáteční fázi infekce, kdy ještě není dostatek obalových proteinů, se nově vytvořené nukleokapsidy s rcDNA vrací zpátky do jádra k amplifikaci počtu kopií cccDNA a tvoří

tak rezervoár virových částic. Obalové proteiny HBV jsou shromažďovány v endoplazmatickém retikulu hepatocytu. Později se na zralé nukleokapsidy navážou obalové proteiny a zralá částice je připravena vydat se sekreční dráhou ven z buňky. (Summers et al., 1990)

2.1.5 Mutanty HBV

Během přepisu virové DNA pomocí reverzní transkripce intermediátu dochází poměrně často k chybám a vznikají mutace. Nejčastěji k mutacím dochází u chronického nosiče jako odpověď na selektivní tlak imunitního systému. Mutanty HBV mohou měnit průběh onemocnění, a tím i jaterní poškození, změnou úrovně replikace nebo exprese imunogenních epitopů. Významně ovlivňují i odpověď na léčbu. Mezi nejvíce klinicky významné patří precore mutanty, HBsAg mutanty a mutanty DNA polymerázy. Mutanty v precore oblasti genomu se vyznačují absencí HBeAg. Významné jsou i HBsAg mutanty nesoucí mutace v genu S, které jsou významné hlavně tím, že mohou způsobit selhání ochranného účinku vakcinace proti HBV. (Stránský, 2001)

Některé mutace mohou vyvolávat i léky, např. lamivudin. (Votava, 2003)

2.1.6 Imunitní odpověď pacienta

Virus obvykle nemá přímý cytopatický efekt na buňky. Poškození jater je důsledkem imunitní odpovědi hostitele. Za destrukci hepatocytů jsou přímo odpovědné cytotoxické T-lymfocyty (Tc-lymfocyty), které reagují na antigeny HBV na povrchu infikované buňky, tím se aktivují a uvolňují specifické cytokiny, které aktivují makrofágy a neutrofilů. Během akutní hepatitidy B nastává rozsáhlá lýza hepatocytů zprostředkovaná Tc-lymfocyty, při čemž dochází k vyloučení HBV. Tato fáze bývá většinou mírná až středně závažná a může končit spontánním vyléčením. V malém procentu případů může dojít k tomu, že nespecifická zánětlivá odpověď hostitele je příliš silná a způsobí masivní poškození jater a vznik fulminantní hepatitidy. Naopak, je-li imunitní odpověď příliš slabá, dochází k vyloučení viru jen málo. Virus pokračuje dál v množení a vyvine se chronická hepatitida. Perzistenci infekce podporuje pravděpodobně nižší buněčná

imunitní funkce vlivem poklesu CD4⁺ T-lymfocytů v periferní krvi a vzestupem CD8⁺ T-lymfocytů nebo T-supresorů. Avšak je zvýšená aktivita NK buněk. Může dojít k mírnému až významnému poklesu C3 a C4 složek komplementu jako důsledek tvorby imunokomplexů. Mohou být zvýšené autoprotilátky. Specifické cytotoxické T-lymfocyty mohou být aktivovány ještě 23 let po akutní infekci, což svědčí o tom, že stopy viru jsou stále přítomny v organismu hostitele dlouhou dobu po infekci. (Stránský, 2001; Sherlocková a Doodley, 2004)

2.1.7 Očkování

Na základě faktu, že HBsAg se v periferní krvi nachází i jako volný, předpokládali Blumberg a Millman, že by se tato částice dala z krve separovat a využít ji k tvorbě vakcíny. Tento předpoklad se potvrdil a v říjnu roku 1969 jménem Institutu pro výzkum rakoviny zažádali o patentování vakcíny proti žloutence typu B. Patent byl začátkem roku 1972 schválen v USA a dalších zemích. (Blumberg et al., 1977)

Od roku 2001 se v naší republice plošně očkuje aktuálně v 9. týdnu věku kojence a ve 12 letech, pokud nebyla vakcína podána v kojeneckém věku. (Stránský, 2001) V současné době se jako preexpoziciční profylaxe používá rekombinantní (rDNA) vakcína vyráběná na kultuře kvasinkových buněk *Saccharomyces cerevisiae* klonováním genu S. Kvasinky tedy exprimují pouze povrchový antigen HBsAg. V současné době je povrchový antigen součástí hexavakcíny Infanrix hexa. (Souhrn údajů o přípravku Infanrix hexa, 2010)

Samostatná vakcína proti HBV je k dispozici pod názvem Engerix a kombinovaná vakcína proti hepatitidě A a B pod názvem Twinrix. (Stránský, 2001; Souhrn údajů o přípravku Engerix, 2014) Pro pacienty s renální insuficiencí je k dispozici vakcína pod názvem Fendrix. (Souhrn údajů o přípravku Fendrix, 2009)

Novorozenci HBsAg pozitivních matek musí být včetně aktivní imunizace i pasivně imunizováni imunoglobulinem (HBIG) do 12hodin od porodu. (Stránský, 2001)

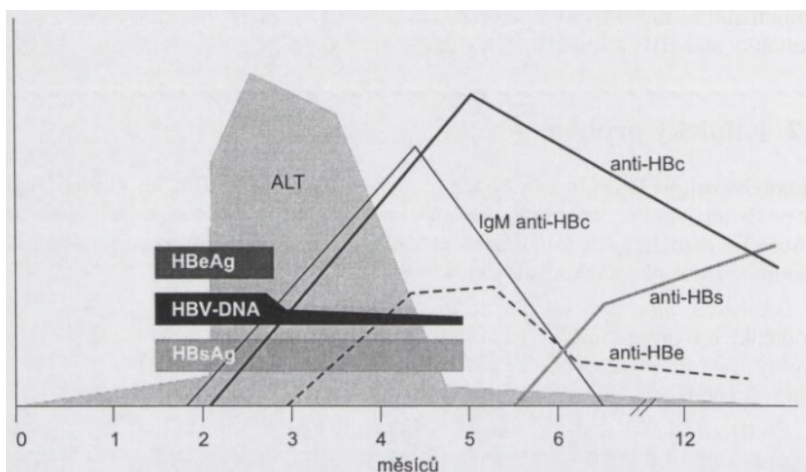
2.2 Stádia infekce HBV

2.2.1 Akutní hepatitida B

Akutní hepatitida B je onemocnění jater provázené akutním zánětem a nekrózou hepatocytů. Diagnosticky je charakterizováno pozitivním nálezem HBsAg (kromě mutant HBV, které HBsAg netvoří) a anti-HBc IgM v séru pacienta s odpovídajícím klinickým a biochemickým obrazem (Obr. 1). Inkubační doba onemocnění obvykle bývá 40-180 dní (průměrně 75 dní) od nákazy do začátku prvních příznaků nebo ikteru. Časté bývají i subklinické formy onemocnění, které se diagnostikují až v chronickém stadiu. (Stránský, 2001)

Počátek onemocnění je pozvolný bez příznaků, případně s nespecifickými příznaky virového onemocnění jako je únava, nauzea a nechutenství. Preikterická fáze, zvaná také prodromální, trvá 3-7 dní. Téměř vždy bývá mírně zvýšená teplota, žaludeční nevolnost a bolesti v kloubech. Často se objevuje i kožní vyrážka. Ve fázi rozvinuté žloutenky se výrazně horší únava a nechutenství. V této fázi je možný projev ikteru, různě intenzivního zežloutnutí kůže, očního bělma a sliznic vlivem zvýšené koncentrace bilirubinu v tkáních. To je hlavním příznakem dysfunkce jater. Ikterická fáze může trvat několik dní až měsíců, průměrně trvá 2-3 týdny. Ústupem žloutenky nastává fáze rekonvalescence, během níž se zlepšuje chuť k jídlu a zmírňuje se únava. (Stránský, 2001)

Akutní hepatitida B může mít i komplikovaný klinický průběh, který bývá doprovázen rozsáhlou jaterní nekrózou, cholestázou nebo se může dokonce vyvinout ve fulminantní hepatitidu B. (Stránský, 2001) Riziko fulminantního jaterního selhání se pohybuje v intervalu 0,1-1% případů. (Husa et al., 2017)



Obr. 1: Serologický průběh akutní hepatitidy B u imunokompetentního pacienta (Stránský, 2001)

2.2.2 Chronická hepatitida B

Při přiměřené imunitní odpovědi by mělo dojít k uzdravení z akutní hepatitidy. V případě, že imunita nemocného není schopná dostatečně eliminovat virus, může onemocnění přejít do chronického stádia s nutností terapeutického zásahu. U dospělých imunokompetentních pacientů s akutní hepatitidou, přejde do chronicity méně než 5%. U oslabených pacientů (po dialýze, protinádorové nebo imunosupresivní léčbě, HIV pozitivních) přechází infekce do chronicity ve více než 50% případů. (Husa et al., 2017)

Hlavním známkou přechodu do chronického stádia je přetrvávání HBsAg v séru déle než 6 měsíců. Průběh se schematicky dělí do pěti fází podle přítomnosti HBeAg, množství HBV DNA, aktivity ALT a případně i podle přítomnosti jaterního zánětu. (Husa et al., 2017)

První fází, dříve zvanou imunotolerantní, je HBeAg pozitivní chronická infekce HBV doprovázená nízkou imunitní odpovědí nemocného. Tuto fázi charakterizuje vysoká úroveň replikace prokazatelná pozitivitou HBeAg a vysokou koncentrací HBV DNA v séru. Nemocný je vzhledem k vysoké virémii vysoce nakažlivý. Aktivita ALT bývá normální nebo nízká. Tato časná fáze může trvat velmi dlouho (10-30 let) a obvykle nedochází k sérokonverzi HBeAg/anti-HBe. (Stránský, 2001; Husa et al., 2017)

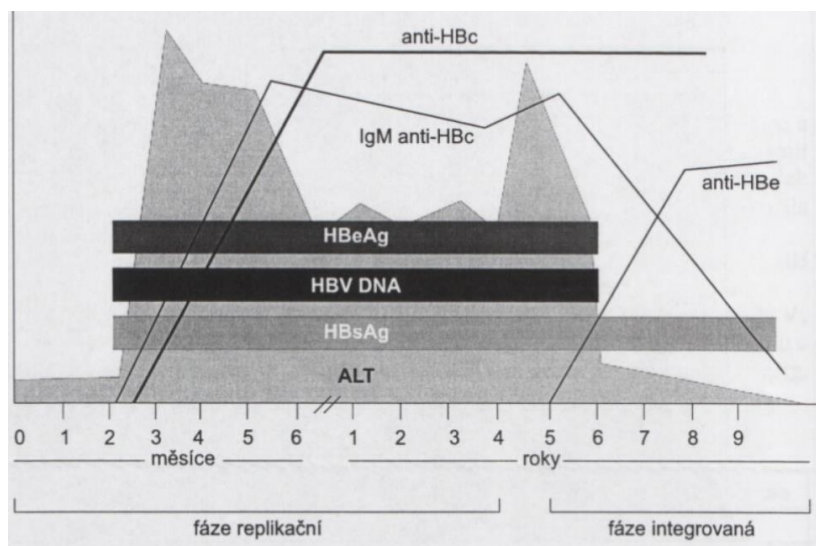
Druhá fáze je HBeAg pozitivní chronická hepatitida B. V této fázi dochází k aktivaci imunitního systému a lýze infikovaných hepatocytů, která se projeví zvýšením aktivity

ALT v séru. Jsou prokazatelné středně až vysoce závažné zánětlivě-nekrotické změny v játrech a progresse jaterní fibrózy. (Stránský, 2001; Husa et al., 2017)

Třetí fází je HBeAg negativní chronická infekce HBV neboli inaktivní nosičství. Pacienti v této fázi jsou HBsAg pozitivní, HBeAg negativní, anti-HBe pozitivní s velmi nízkou až nedetekovatelnou hladinou HBV DNA v séru. Aktivita ALT je v normě, zánětlivě-nekrotická aktivita v játrech je minimální a stupeň fibrózy nízký. Riziko vzniku jaterní cirhózy či HCC je v této fázi nízké, stále však existuje možnost progresse do chronické hepatitidy. U 1-3 % případů ročně dochází spontánně k vymizení HBsAg a/nebo sérokonverzi HBsAg/anti-HBs. (Husa et al., 2017)

Čtvrtá fáze, HBeAg negativní chronická hepatitida B, může následovat po HBeAg/anti-HBe sérokonverzi v druhé fázi. Pacienti jsou HBsAg pozitivní, HBeAg negativní, anti-HBe pozitivní stejně jako u třetí fáze, ovšem hladina HBV DNA je střední až vysoká a bývá i přechodně nebo trvale zvýšená aktivita ALT. Jaterní biopsie těchto pacientů prokazuje zánětlivě-nekrotické změny a fibrózu. Přestože virová replikace evidentně probíhá vzhledem k množství HBV DNA v séru, jsou pacienti HBeAg negativní. To je způsobeno mutací v precore nebo v basal core promotoru v genomu viru. V této fázi je nízká pravděpodobnost spontánní remise onemocnění. (Husa et al., 2017)

Pátá fáze, okultní infekce HBV, je charakterizovaná vymizením HBsAg, pozitivními celkovými protilátkami anti-HBc a normální aktivitou ALT. V séru už není HBV DNA obvykle detekovatelná, ale v jaterní tkáni ji lze prokázat. Při imunosupresi stále může dojít k reaktivaci infekce. (Husa et al., 2017)



Obr. 2: Serologický průběh chronické infekce HBV (Stránský, 2001)

2.2.3 *Komplikace chronické hepatitidy*

Jednou z nejčastějších komplikací chronické hepatitidy je jaterní cirhóza. Vzniká mnoho let po infekci HBV, avšak rychleji než po infekci HCV. Rychlost vzniku významně koreluje s aktivitou virové replikace. Velkým rizikovým faktorem jsou taktéž opakované relapsy onemocnění, které někdy mohou být těžké až život ohrožující. Cirhóza v důsledku HBV infekce má podobný průběh jako cirhózy s jinými příčinami. (Stránský, 2001)

Vzniku jaterní cirhózy předchází jaterní fibróza způsobená hepatocelulární nekrozou. Fibrogenese je komplexní proces, kterého se účastní především stelární (Itóovy) buňky, cytokiny, proteinázy a jejich inhibitory. Přetváří se extracelulární matrix vlivem zvýšené tvorby pojivové tkáně a jejího sníženého odbourávání. Proces fibrotizace jater je do jisté míry reverzibilní. Cirhóza tolik reverzibilní není, ale při odstranění etiologického agens již nemusí progredovat a může se objevit i regrese. (Sherlocková a Doodley, 2004)

Klinický obraz cirhózy nejčastěji tvoří příznaky jako je ikterus, ascites, portální hypertenze provázená jícnovými varixy, encefalopatie atd. Posouzení stadia jaterní cirhózy v praxi se opírá o Childovu-Pughovu klasifikaci jaterních cirhóz, která zohledňuje koncentraci bilirubinu a albuminu v séru, přítomnost ascitu a otoků, změny CNS, protrombinový čas a kvalitu výživy. Na základě těchto ukazatelů vyhodnocuje předpokládanou pooperační úmrtnost a přežití 5 let. (Stránský, 2001; Sherlocková a Doodley, 2004)

Chronická hepatitida B a jaterní cirhóza jsou významnými rizikovými faktory pro vznik hepatocelulárního karcinomu (HCC). Virus indukuje vznik nádoru integrací své DNA do genomu hostitele, transaktivací a mutacemi v tumor-supresorových genech jako je například onkogen p53 na chromozomu 17. Klinické manifestace HCC mohou být různé. Nejčastějšími příznaky bývají bolesti v horní části břicha nebo v zádech, slabost, úbytek váhy, gastrointestinální příznaky jako je nechutenství, časté pocity plnosti, nadýmání a zácpa, nebo naopak průjem. Pacienti s HCC mohou být i zcela bez příznaků a nález se zjistí náhodou při screeningovém vyšetření. (Stránský, 2001; Sherlocková a Doodley, 2004)

Výskyt zhoubných novotvarů jater je v České republice celkem nízký. Incidence zhoubných novotvarů jater a intrahepatálních žlučových cest za rok 2016 byla 595

případů u mužů a 323 u žen, to odpovídá 1,2 % (muži) a 0,7 % (ženy) z celkového počtu zhoubných novotvarů za rok 2016 v ČR. (Novotvary 2016, 2016)

2.3 Laboratorní diagnostika

2.3.1 Sérologické markery

HBsAg je hlavním vyšetřovaným markerem infekce HBV. Objevuje se v krvi zhruba po 6 týdnech od infekce. Jeho nálezný v séru značí probíhající expresi povrchových antigenů viru a charakterizuje tak aktivní infekci HBV. (Krekulová, 2002; Stránský, 2001) Negativní výsledek nemusí znamenat nepřítomnost infekce. V ojedinělých případech může být pacient ještě v inkubační době či infekce může být v inaktivním latentním stádiu s potenciálem k reaktivaci. (Stránský, 2001) Existují i tzv. escape mutanty viru, kde není přítomen HBsAg vlivem mutace genu pro protein HBs. (Krekulová, 2002)

Anti-HBs je protilátka proti povrchovým proteinům HBs. Je pozdní protilátkou, tvoří se až ve fázi rekonvalescence. Po prodělané infekci přetrvávají zpravidla po zbytek života ve vysokých titrech. (Stránský, 2001) Stanovení hladiny této protilátky má význam i pro zjištění, zda pacient vyvinul dostatečnou ochrannou hladinu protilátek po očkování. (Laboratorní příručka OKB, 2019)

HBcAg není detekovatelný v séru, nachází se pouze v infikovaných hepatocytech, avšak je vysoce imunogenní a indukuje tvorbu protilátek anti-HBc ve vysokých titrech. (Stránský, 2001)

Protilátka anti-HBc je detekovatelná v celém průběhu infekce HBV. Anti-HBc IgM je časnou protilátkou a spolu s HBsAg hlavním diagnostickým markerem probíhající akutní infekce. V případě diagnostického okna, kdy při nástupu tvorby anti-HBs protilátek přestane být HBsAg detekovatelný, může být anti-HBc IgM jediný marker akutní infekce. Je však prokazatelná i za několik let po akutní infekci a také během exacerbací chronické hepatitidy B. (Stránský, 2001)

HBeAg je všeobecně považován za marker replikace a vysoké infekivity. (Votava, 2003) Sérokonverze HBeAg na anti-HBe nastává u imunokompetentních pacientů s akutní infekcí časně před sérokonverzí HBsAg na anti-HBs a obvykle je provázena vymizením

HBV DNA a příznaků jaterního onemocnění. U pacientů s chronickou infekcí HBV může k sérokonverzi dojít i za roky až desetiletí. Existuje malé procento pacientů s aktivní infekcí HBV, u kterých není přítomen HBeAg. U těchto pacientů je pravděpodobně přítomna mutace stopkodonu v precore region, která neumožňuje viru produkovat HBeAg. Virus ale i tak dokáže pokračovat v replikaci. (Stránský, 2001)

Protilátky anti-HBe přetrvávají dlouhodobě a značí, že pacient již není v akutní fázi onemocnění a je relativně málo infekční. (Laboratorní příručka OKB, 2019)

Vyšetření všech markerů HBV dokáže dát poměrně přesný náhled na stav pacienta (Obr. 3).

INTERPRETACE NĚKTERÝCH NÁLEZŮ V KRVÍ PŘI INFEKCI HBV							
HBV DNA	HBeAg	HBsAg	IgM anti-HBc	IgG anti-HBc	anti-HBe	anti-HBs	interpretace
+	+	+	+	- n. +	-	-	akutní infekce
+	- n. +	+	+ n. -	+	+ n. -	-	chronická infekce
-	-	+	-	+	+	-	chronické nosičství
-	-	-	-	+	+	+	stav po prodělané infekci s uzdravením
-	-	-	-	-	-	+	stav po očkování, bez známek infekce

Obr. 3: Interpretace některých nálezů v krvi při infekci HBV (Votava, 2010)

2.3.2 Biochemické markery

Základní biochemická vyšetření významně přispívají ke správnému určení diagnózy hepatitidy B. (Stránský, 2001) Nejdůležitějšími markery jaterního poškození jsou transaminázy alaninaminotransferáza (ALT) a aspartátaminotransferáza (AST). ALT je cytosolový enzym katalyzující přenos aminoskupiny z alaninu na 2-oxoglutarát za vzniku pyruvátu a glutamátu. Největší podíl tohoto enzymu se nachází v játrech, je proto specifitější markerem jaterního poškození než AST. AST je enzym katalyzující přenos aminoskupiny z aspartátu na 2-oxoglutarát za vzniku oxalacetátu a glutamátu. Vyskytuje se ve dvou izoformách, cytoplazmatické a mitochondriální. Je přítomný v játrech, kosterním svalu a srdečním svalu zhruba ve stejném podílu. Zvýšená hladina ALT a cytoplazmatického izoenzymu AST v séru pacienta vlivem porušení permeability membrány hepatocytu značí akutní reverzibilní poškození buněk. Závažné, ireverzibilní,

poškození jater je provázeno uvolněním mitochondriálních enzymů, a to především mitochondriální izoenzym AST a glutamátdehydrogenázy (GMD). Pokud je onemocnění doprovázeno ikterem, bývá zvýšena hodnota také bilirubinu, především nekonjugovaného, vlivem porušení konjugace bilirubinu. (Stránský, 2001; Sherlock et al., 2002; Schneiderka et al., 2004; Koolman et al., 2012)

2.3.3 Molekulární diagnostika

Molekulární diagnostika se opírá o průkaz DNA viru hepatitidy B v séru pacienta. HBV DNA v séru ukazuje na aktivní replikaci viru i v případě nepřítomnosti specifických antigenů (HBeAg, HBsAg) u mutant HBV. Pozitivní nález značí vysokou infektivitu pacienta. (Stránský, 2001)

HBV DNA může být detekována více způsoby. Nejcitlivějším a zároveň nejspecifičtějším testem je polymerázová řetězová reakce (PCR). Umožňuje detekovat i velmi nízké hodnoty HBV DNA v HBsAg negativním séru. (Stránský, 2001) Mezi další metody stanovení HBV DNA patří molekulární hybridizace bez amplifikace DNA (např. Murex Diagnostics Ltd) nebo s amplifikací založenou na technologii rozvětvené DNA (Quantiplex HBV DNA, Chiron Diagnostics). (Zima, 2007)

Hlavní klinický význam průkazu HBV DNA je v posouzení aktivity replikace u chronických nemocných pacientů a zvažení antivirové léčby, jejímž hlavním cílem je zastavení replikace a vyloučení HBV DNA. (Stránský, 2001)

2.3.4 Histologická diagnostika

Histologické vyšetření jaterní tkáně získané jaterní biopsií slouží k potvrzení diagnózy a etiologie, ke stanovení aktivity (grade) a stádia (stage) jaterního poškození (fibrózy) a případně i k potvrzení cirhózy. Používá se především Van Giesenovo barvení, barvení na elastin, stříbro a PAS. (Sherlocková a Doodley, 2004)

Akutní hepatitida je doprovázena skvrnitými nekrózami a degenerací hepatocytů. Zároveň probíhají i reparační procesy a mitózy. Může docházet k přemostění (bridging)

a splývání nekróz, které již značí přechod do chronického onemocnění. (Stránský, 2001; Sherlocková a Doodley, 2004)

U chronických nosičů a chronicky infikovaných lze přítomnost HBcAg v jaterních buňkách prokázat barvením jaterní tkáně orceinem. (Sherlocková a Doodley, 2004)

2.4 Léčba

Většina dospělých imunokompetentních pacientů s akutní hepatidou B se vyléčí spontánně a nepotřebují specifickou léčbu. Avšak pacienti s těžkým průběhem s koagulopatií nebo protahovanou akutní infekcí by měli být léčeni, hlavně kvůli snížení rizika jaterního selhání, progresu do chronicity a jaterní cirhózy, dekompenzace cirhózy a vzniku hepatocelulárního karcinomu. Pacienti s chronickou hepatidou B jsou posuzováni k léčbě na základě aktivity ALT, množství HBV DNA v séru a stupně fibrózy jater (měření tuhosti jater neinvazivními metodami, zejména tranzientní elastografií). V současnosti se v ČR a Evropské unii k léčbě HBV používají antivirotika ze skupiny nukleosidových/nukleotidových analogů (NA), které cílí na reverzní transkriptázu viru. Mezi ty patří lamivudin, adefovir dipivoxil, entecavir, telbivudin, tenofovir disiproxil fumarát a tenofovir alafenamid. (Husa et al., 2017)

3. Cíl práce a hypotézy

Cílem mé bakalářské práce je seznámení s problematikou onemocnění virové hepatitidy typu B a popis současných možností diagnostiky se zaměřením na stanovení markerů hepatitidy B metodou elektrochemiluminiscenční imunoanalýzy pomocí přístroje COBAS e601 firmy ROCHE a kvantifikaci virové DNA na přístroji COBAS 4800 firmy ROCHE metodou real time PCR. Soubor vyšetřovaných vzorků pochází z laboratoře infekční sérologie a virologie společnosti VIDIA-DIAGNOSTIKA.

První hypotézou, kterou budu během praktické části ověřovat je, že výskyt HBsAg pozitivních pacientů bude mezi muži a ženami podobný. Předpokládám, že nejvyšší četnost positivity ze sérologických markerů infekce (mimo postvakcinační protilátky anti-HBs) bude vykazovat anti-HBc Ig total. Domnívám se, že pozitivita se bude týkat především lidí kolem 30-50 let a poměr mužů a žen bude také přibližně vyrovnaný.

4. Metodika

4.1 Preanalytická příprava

Pro laboratorní diagnostiku HBV naše laboratoř využívá výhradně krevní sérum, které se získává odběrem venózní krve pacienta do zkumavky s červeným uzávěrem pro odběr srážlivé krve. Výrobce Roche uvádí, že je možné použít i krevní plasmu získanou odběrem periferní krve do zkumavky s protisrážlivým činidlem (heparin lithný/sodný, K₂EDTA, K₃EDTA, citrát sodný). (Metodický list Elecsys HBsAg, 2020)

Velkou roli hraje i samotná příprava pacienta před odběrem. Pacientům je doporučováno před odběrem dostatečně pít a vyvarovat se tučných jídel, kvůli možné interferenci lipemického séra. Dobré je omezit alkohol minimálně 24 h před odběrem. Alkohol také způsobuje vzestup koncentrace triacylglycerolů, a tím se stává sérum lipemické. Samotný odběr by se měl provádět pacientovi vleže. Stažení paže a cvičení paží při venózním odběru má trvat pouze krátce, aby nedošlo k přesunu tekutiny z cév do intersticia. Před centrifugací a transportem je nutné nechat krev stát alespoň 20 minut při pokojové teplotě, aby se zamezilo hemolýze a vzniku fibrinové sraženiny v separovaném séru, která by mohla způsobit ucpaní špiček při nasávání vzorku přístrojem. Při odběru nesrážlivé krve je potřeba dodržet daný poměr objemu přidané krve a antikoagulantu ve zkumavce. Odebere-li se menší množství krve, může dojít k hemolýze, odebere-li se větší množství, krev se srazí. Krev se musí poté dokonale promíchat otáčením zkumavky, nesmí se třepat, aby nedošlo k mechanické hemolýze. Hemoglobin uvolněný hemolýzou erytrocytů ovlivňuje fotometrická stanovení analytů. (Racek, 2006)

Se vzorky určenými pro PCR se musí pracovat sterilně, aby se zamezilo možné kontaminaci a znehodnocení výsledků.

Vzorky séra či plasmy jsou stabilní 7 dní při teplotě 2-8°C, 3 měsíce při teplotě -20°C (±5°C). Vzorky se mohou rozmrazit až 6krát a použít k tomuto typu vyšetření. (Metodický list Elecsys HBsAg, 2020)

4.2 Stanovení markerů hepatitidy metodou ECLIA

Elektrochemiluminiscence (ECL) je metoda vycházející ze spojení chemiluminiscence a elektrochemie. Luminiscence je jev, při kterém dochází k excitaci elektronu za současného vyzáření světla bez tepelných účinků. Existuje několik typů luminiscence lišící se způsobem vyvolání excitace elektronu. Při chemiluminiscenci dochází k excitaci elektronu při chemických reakcích. Emitace světla při ECL je vyvolána excitací luminoforu a koreaktantu elektrickým napětím a následnými oxidačně-redukčními reakcemi na elektrodě. (Miao, 2008)

Elektrochemická reakce v ECL umožňuje kontrolou času a polohy reakce emitující světlo. Reakce emitující světlo může být pozdržena, dokud neproběhnou potřebné imunologické nebo enzymatické děje. Pro kontrolu polohy reakce se využívá např. magnetických kuliček, na které se navážou potřebné složky analyzované směsi. Nepotřebné složky se odstraní promytím směsi. Díky cílenému řízení elektrodového potenciálu je selektivnější než samotná chemiluminiscence. ECL v imunoanalýze využívá nejčastěji tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) komplexu, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, jako luminoforu a tri-*n*-propylaminu, TPrA, jako oxidačně-redukčního koreaktantu. Ru^{2+} je na elektrodě oxidován na Ru^{3+} , zároveň TPrA je oxidován na radikál TPrA^+ , který slouží v reakci jako reduktant, snadno redukuje Ru^{3+} zpět na Ru^{2+} . Přechodem elektronu z TPrA do vyšší energetické hladiny kationtu ruthenia se vyzáří foton a komplex ruthenia je schopen se znovu oxidovat. Takto probíhá reakce cyklicky a výsledný světelný signál se násobí. TPrA je v reakci spotřebován. Metody s ECL systémem $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{TPA}$ jsou díky své vysoké výtěžnosti velice citlivé. Na základě těchto vlastností tvoří základ ECL komerčních systémů pro imunoanalýzu a DNA analýzu. (Miao, 2008)

4.2.1 Princip metody

Detekce markerů hepatitidy B probíhá trojím způsobem. Antigeny HBsAg, HBeAg a protilátka anti-HBs jsou diagnostikovány sendvičovou metodou. IgM protilátky se stanovují metodou μ -Capture a protilátky anti-HBc IgG a anti-HBe se detekují kompetitivní metodou.

Sendvičová metoda: Prvním krokem je inkubace patientského vzorku s monoklonální protilátkou anti-HBe s kovalentně vázaným biotinem a monoklonální protilátkou anti-HBe označenou komplexem ruthenia. V případě detekce HBsAg jsou přidány dvě protilátky anti-HBs s navázaným biotinem a směs monoklonální a polyklonální protilátky anti-HBs s komplexem ruthenia. Pokud vyšetřovaný vzorek obsahuje antigeny, vytvoří s protilátkami tzv. sendvičový komplex. Další postup reakce je stejný u všech tří metod. Do směsi se přidají paramagnetické mikročástice potažené streptavidinem. Biotin v imunokomplexu vytvoří silnou vazbu se streptavidinem na mikročásticích. Celý mix se přenesse do měřicí kyvety, kde jsou částice magneticky zachyceny na povrchu měřicí kyvety, zbytek je odstraněn promytím. Promývací roztok obsahuje koreaktant TPA, který je esenciální pro ECL reakci. Aplikace elektrického napětí na elektrodě vyvolá ECL reakci, během které dochází k emisi fotonů, které jsou měřeny fotonásobičem. Výsledný signál je ekvivalentní koncentraci analytu ve vzorku. Výsledky jsou automaticky zpracovány přístrojem, který porovná elektrochemiluminiscenční signál produktu reakce s cutoff hodnotou kalibrace. (Metodický list Elecsys HBsAg, 2020; Metodický list Elecsys anti-HBs, 2020; Metodický list Elecsys HBeAg, 2019)

μ -Capture: Patientský vzorek je nejdříve inkubován s anti-Fd γ protilátkou, čímž se inaktivují specifické IgG, které by mohly způsobit interferenci, a tím nesprávný výsledek. K takto upravenému vzorku se přidá monoklonální specifická protilátka h-IgM s navázaným biotinem, HBcAg označený komplexem ruthenia a mikročástice potažené streptavidinem. Pokud jsou ve vzorku přítomné protilátky anti-HBc IgM, reagují s HBcAg. Na navázané protilátky anti-HBc IgM se naváže sekundární protilátka anti-h-IgM s biotinem a vytvoří sendvičový komplex, který se díky interakci biotinu a streptavidinu zachytí na mikročástice. Směs je přenesena do měřicí kyvety, kde se mikročástice magneticky přitáhnou k elektrodě, promyje se a výboj vyvolá chemiluminiscenční emisi, která je měřena fotonásobičem. (Metodický list Elecsys anti-HBc IgM, 2019)

Kompetitivní metoda: Ke vzorku se přidá antigen HBeAg/HBcAg podle toho, která protilátka se vyšetřuje. Pokud jsou ve vzorku přítomny, vytvoří s antigeny imunokomplex. Do směsi se přidají biotinylované protilátky, specifické anti-HBc protilátky označené komplexem ruthenia a mikročástice potažené streptavidinem. Volná

vazebná místa na antigenech se zaplní a celý komplex se naváže na mikročástice. Další kroky jsou stejné jako u předchozích dvou postupů. Výsledek se však liší v tom, že pokud jsou protilátky v patientském vzorku přítomny, zaplní vazebná místa na přidaném antigenu a značené protilátky se již nemají kde navázat. Nejsou-li přítomny, navážou se označené protilátky. Výsledný signál je nepřímo úměrný koncentraci hledaných protilátek ve vzorku. (Metodický list Elecsys anti-HBc IgG, 2019; Metodický list Elecsys anti-HBe, 2019)

4.2.2 cobas® e601

Cobas® e601 (obr. 4) je plně automatický analyzátor firmy Roche diagnostics pracující na principu elektrochemiluminiscence popsané v předchozích podkapitolách. Reagencie, kontroly i kalibrátory se využívají výhradně od firmy ROCHE a jsou součástí uzavřeného systému ELECSYS (obr. 5). Kontroly a kalibrátory jsou vyráběné z lidského séra, tudíž by se s nimi mělo zacházet jako s potenciálně infekčním materiálem. (Metodický list Elecsys HBsAg, 2020)

Kontroly se stanovují každý den před započítím vyšetřování patientských vzorků a při každé změně šarže reagenčního kitu. Kalibrace se provádí pouze při změně šarže reagensů.

Pacientské vzorky se do přístroje vkládají ve speciálních stojácích (obr. 6). Každému pacientovi při příjmu materiálu je přidělen čárový kód, který přístroj načte a provede vyšetření zadaná v laboratorním informačním systému.



Obr. 4: Analyzátor cobas® e601 firmy ROCHE (Zdroj vlastní)



Obr. 5: Reagenční kit HBsAg s kalibrátory (Zdroj: <https://www.biolab-srl.com/products/elecsys-hbsag-2-gen-calibrator/>)



Obr. 6: Připravený stojánek s patientskými vzorky (Zdroj vlastní)

4.2.3 HBsAg konfirmace

U vzorků, které vyšly opakovaně reaktivní na HBsAg se doplňuje HBsAg konfirmace. Vzorek séra se rozdělí do dvou zkumavek po stejném množství, které je dané podle výsledku COI z předchozího měření HBsAg ECLIA metodou. Do jedné zkumavky se přidá konfirmační reagensie, která obsahuje specifické polyklonální protilátky anti-HBs vázající se na imunodominantní epitopy HBsAg. Tím se neutralizuje všechny HBsAg ve vzorku, pokud je ve vzorku přítomný. Do druhé zkumavky se přidá kontrolní reagensie a opakuje se vyšetření HBsAg v přístroji cobas®. Neutralizace HBsAg ve vzorku by měla snížit signál vzorku, a tím i celkové hodnoty cutoff indexu. (Metodický list Elecsys HBsAg Confirmatory test, 2020)

4.2.4 Hodnocení výsledků

Výsledky měření jsou zpracovány přístrojem. Hodnota signálu vyšetřovaného vzorku je dělena cutoff hodnotou získanou předchozí kalibrací kalibračními roztoky pro jednotlivé analyty. Tím získáme tzv. cutoff index (COI), podle kterého se hodnotí výsledek vyšetření markerů hepatitidy jako reaktivní, hraniční, nebo nereaktivní (tab.1). Výsledek vyšetření anti-HBs protilátek se nehodnotí pomocí cutoff indexu, samotná hodnota je vypovídající a uvádí se v mezinárodních jednotkách IU (tab. 2). Před hodnocením výsledků HBsAg konfirmace (tab. 3) by se měla nejprve ověřit platnost testu. Test je platný, pokud cutoff index vzorku s konfirmační reagensií (x) je $\leq 60\%$ z hodnoty COI vzorku s kontrolní reagensií a zároveň COI vzorku s kontrolní reagensií musí být $\geq 0,81$. Pokud je COI $<0,81$, byl vzorek příliš zředěn a je nutno konfirmaci opakovat s menším množstvím reagensií.

Tab. 1: Hodnocení výsledků ECLIA metody

Marker	COI	Výsledek
HBsAg, HBeAg, anti-HBc IgM	<0,9	nereaktivní
	0,9<1,1	hraniční
	≥1,1	reaktivní
Anti-HBe, anti-HBc	>1,0	nereaktivní
	≤1,0	reaktivní

Zdroj dat: Metodické listy Elecsys HBsAg, HBeAg, anti-HBc IgM, Anti-HBe a anti-HBc, Roche Diagnostics

Tab. 2: Hodnocení výsledků anti-HBs protilátek

Marker	Hodnota výsledku	Interpretace výsledku
Anti-HBs	<10 mlU/mL	Negativní
	≥10 mlU/mL	Pozitivní

Zdroj dat: Metodický list Elecsys anti-HBs, Roche Diagnostics

Tab. 3: Hodnocení výsledku HBsAg konfirmace

	COI kontrolního vzorku	Interpretace
x > 60 %	≥ 0,81	Nereaktivní
x > 60 %	< 0,81	Neplatný
x ≤ 60 %	≥ 0,81	Pozitivní
x ≤ 60 %	< 0,81	Neurčitý

Zdroj dat: Metodický list Elecsys HBsAg Confirmatory Test, Roche Diagnostics

4.3 Kvantifikace DNA HBV pomocí real-time PCR

Polymerázová řetězová reakce je metoda molekulární biologie, při níž se exponenciálně množí neboli amplifikuje specifický úsek DNA. Během PCR dochází k denaturaci, hybridizaci (annealing) a syntéze DNA. Celá reakce probíhá v thermocyclerech, které cyklicky mění teplotu reakční směsi pro jednotlivé kroky. (Kočárek, 2007) V současnosti se nejvíce využívají thermocyclery, které během reakce měří množství fluorescenčně značené DNA.

V naší laboratoři využíváme k molekulární diagnostice HBV DNA systém cobas® 4800, který se skládá z automatického izolátoru x480 (obr. 7) a analyzátoru z480 (obr. 8). Analyzátor cobas® z480 je blokový thermocykler s integrovanou real-time PCR detekcí ve čtyřech kanálech. Toho se využívá při multiplexních real-time PCR stanoveních různých signálů během jedné série. Systém cobas® 4800 má vlastní software, který řídí celý průběh práce a automaticky zpracovává výsledky.

Ke kvantifikaci virové nálože se používá jako kvantifikační standard DNA bakteriofágu lambda (DNA QS), který slouží i jako vnitřní kontrola přípravy vzorků a PCR amplifikace.



Obr. 7: cobas® x480 (Zdroj: Uživatelská příručka k systému cobas® 4800)

Komponenty přístroje cobas® x480:

- Pipetovací rameno s pipetovací hlavou
- Automatický podavač s čtečkou barkódů
- Stacionární nosič pro zpracování vzorků s ohřívací/třepací jednotkou, magnetickou destičkou, držákem archivní plotny a držákem mikrotitrační destičky
- Autozaváděcí plocha
- Nosič archivní plotny a mikrotitrační destičky
- Nosič stojanu špiček – pravý a levý
- Nosič 200 ml reagenčního zásobníku
- Nosič 50 ml reagenčního zásobníku
- Nosič reagensí
- Zásobník kapalného odpadu



Obr. 8: cobas® z480 (Zdroj: Uživatelská příručka k systému cobas® 4800)

4.3.1 Izolace a purifikace DNA

Nejdříve se musí z vyšetřovaného vzorku izolovat a purifikovat DNA, která se bude později amplifikovat. Izolaci lze provést ručně nebo pomocí automatických izolátorů. Většina zdravotnických laboratoří provádějící rutinní vyšetření využívají automatické izolátory, např. croBEE (Geneproof), cobas® x480 (Roche), MagNa Pure 24 (Roche), iCATCHER (Biovendor) a další.

V softwaru cobas® 4800 nastavíme objednávku vyšetření. Připravíme patientské vzorky, reagentie, kontroly a spotřební materiál do příslušných nosičů. Nosiče se poté vkládají do přidělených pozic na autozaváděcí plochu podle pokynů softwaru. Všechny vkládaný materiál má čárové kódy, které si přístroj načte během zavádění nosičů, některé načítáme ruční čtečkou barkódů před zavedením nosiče.

Pro extrakci DNA ze vzorku se musí DNA uvolnit. K tomu se používá lyzační/extrakční pufr, jehož základní složkou je tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), který udržuje pH celé směsi. Dále obsahuje detergenty (nejčastěji Triton X-100 nebo dodecylsulfát sodný, SDS, systém cobas® 4800 používá polidocanol), kyselinu ethylendiaminotetraoctovou (EDTA), proteinázu K, dithiothreitol, guanidin thiokyanát a další složky. Vlivem detergentu v lyzačním pufru se poruší buněčné membrány. Za normálních podmínek by došlo k degradaci nukleových kyselin působením nukleáz v cytoplazmě buňky, ale EDTA v lyzačním pufru vytvoří komplex s vápenatými ionty, které jsou nezbytné pro funkci nukleáz, a tím je inaktivuje. Proteináza K štěpí proteiny včetně již zmíněných nukleáz. Dithiothreitol díky svým silně redukčním účinkům redukuje disulfidické můstky proteinů, a tím pomáhá další denaturaci. Guanidin thiokyanát plní úlohu chaotropní soli, zvyšuje iontovou sílu roztoku a díky tomu se DNA adsorbuje na povrch magnetických částic potažených silikátovým sklem. Směs se promyje pufr, odstraní se tak denaturované proteiny, inhibitory PCR a další nepotřebné zbytky. Následně se směs promyje elučním roztokem (TRIS pufr s methyl-4-hydroxybenzoátem) za zvýšené teploty. Čistá izolovaná DNA s master mixem je připravená v mikrotitrační destičce k amplifikaci. Před vyjmutím je nezbytné destičku důkladně utěsnit krycí fólií. Eliminuje se tak kontaminace při přesunu destičky do analyzátoru a vypařování při vysokých teplotách při PCR reakci. (Kočárek, 2007; Metodický list Kvantitativní test nukleových kyselin..., 2019)

4.3.2 Amplifikace DNA

Mikrotitrační destičku s fólií přesuneme do analyzátoru cobas® z480. Pomocí tlačítka Load se vysune nosič, do kterého vložíme destičku. Amplifikace a následná detekce se spustí automaticky.

Pro amplifikaci je klíčová reagentie zvaná master mix. Jedná se o směs, která obsahuje enzymy (zejména termostabilní DNA polymerázu, Taq polymerázu), primery, nukleotidy, specifické detekční sondy pro HBV a pro DNA-QS (každá značená jinou fluorescenční barvou) a další složky optimalizující reakci (Mg^{2+} soli, TRIS pufr). Izolovaná DNA ve vyšetřovaném vzorku denaturuje za zvýšené teploty 92-98 °C, tím se struktura DNA rozvolní na jednotlivá vlákna, která slouží jako templát. Následně se ohraničí oblast DNA k amplifikaci pomocí tzv. primerů, krátkých úseků DNA o známé sekvenci, které hybridizují s cílovými sekvencemi DNA vyšetřovaného vzorku při teplotě 40-65 °C. Během této fáze nasedají na HBV DNA a DNA-QS detekční sondy obsahující fluorofor a tlumič. Zvýšením teploty na 70-74 °C se zahájí elongace nukleotidových řetězců. Na 3'konce navázaných primerů se naváže DNA polymeráza a připojí komplementární nukleotidy. Ve chvíli, kdy DNA polymeráza dorazí k detekční sondě na vlákně templátu, postupně ji odštěpí, tím dojde k oddělení fluoroforu a tlumiče za vzniku fluorescenčního signálu. Takto popsaný cyklus se opakuje až 40krát k dosažení signifikantního množství produktu. (Kočárek, 2007; Metodický list Kvantitativní test nukleových kyselin..., 2019)

4.3.3 Hodnocení výsledků

Software vyhodnotí platnost výsledků na základě výsledku tří kontrol. V každé sérii se stanovuje jedna negativní kontrola, jedna slabě pozitivní a jedna vysoce pozitivní kontrola. Pokud by kontroly nevyšly ve stanoveném intervalu, software automaticky označí výsledky jako neplatné.

Koncentrace HBV DNA se udává v mezinárodních jednotkách na mililitr (IU/ml). Spodní detekční limit stanovení pomocí real time PCR je 10 IU/ml. Horní detekční limit je 10^9 IU/ml. Nízká virémie je do 2000 IU/ml. Vysoká nad 20 000 IU/ml.

Výsledky jsou zpracovány automaticky přístrojem. Software přidělí každému vzorku na základě změřeného signálu kategorii „Target not detected“ nebo „HBV DNA detected“ (tab. 4).

Tab. 4: Interpretace výsledků kvantifikace HBV DNA

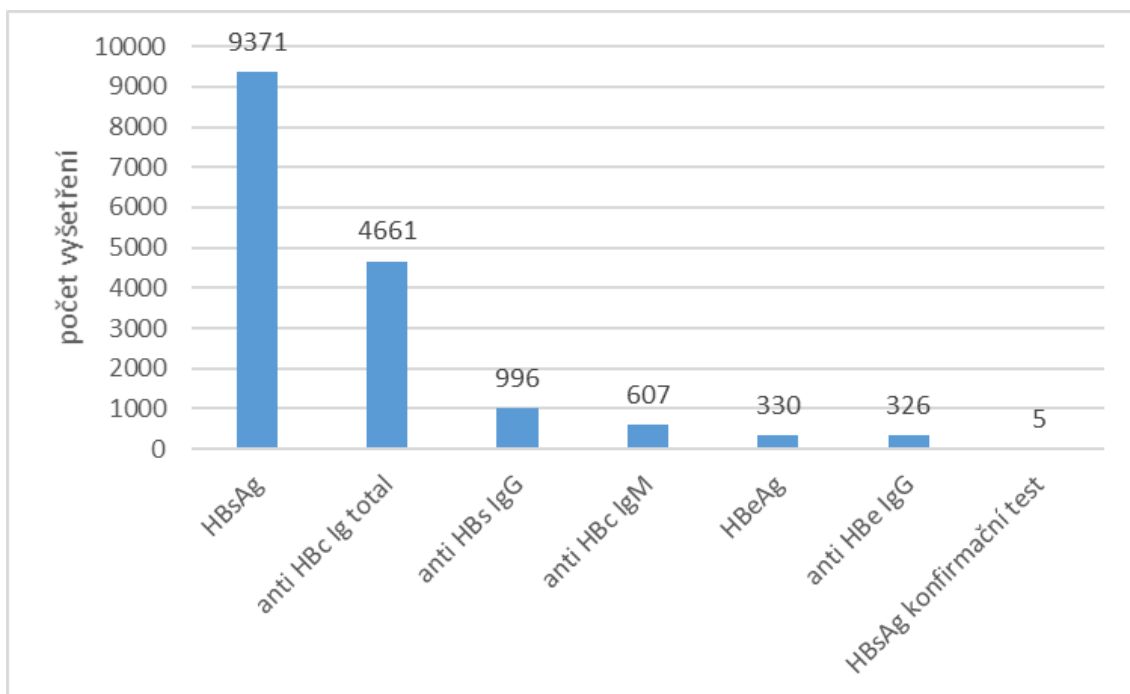
Hlášení softwaru	Výsledek	Interpretace
Target not detected	HBV DNA nebyla detekována	HBV nedetekován
<Titer Min	Vypočtený titer je pod spodním limitem kvantifikace analýzy.	HBV detekován, méně než (min. titer)
Titr	Vypočtený titer leží v lineárním rozmezí analýzy (\geq min. titru a \leq max. titru).	(Titr) HBV detekován
>Titer Max	Vypočtený titer je nad horním limitem kvantifikace analýzy.	HBV detekován, více než (max. titer)

5. Výsledky

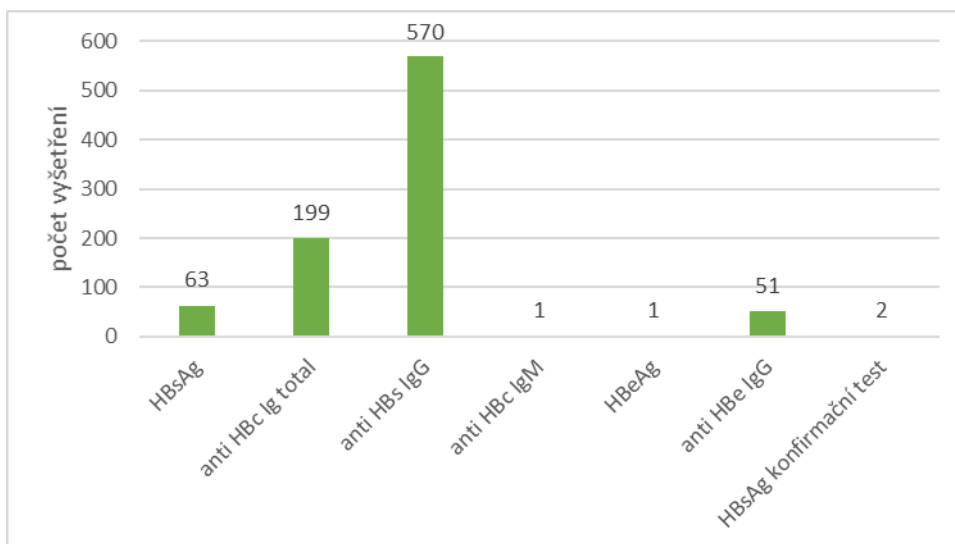
Za rok 2019 bylo v Laboratoři infekční sérologie a virologie společnosti Vidia diagnostika spol. s.r.o. provedeno 16 296 vyšetření sérologických markerů hepatitidy B a 489 vyšetření HBV DNA.

5.1 Sérologické markery

Z celkového množství 16 296 vyšetření bylo 9 371 HBsAg, 4 661 anti-HBc Ig total, 996 anti-HBs IgG, 607 anti-HBc IgM, 330 HBeAg, 326 anti-HBe IgG a 5 HBsAg konfirmací (graf 1). Z toho bylo pozitivních 63 stanovení HBsAg, 199 anti-HBc Ig total, 570 anti-HBs IgG, 1 anti-HBc IgM, 1 HBeAg, 51 anti-HBe IgG a 2 HBsAg konfirmace (graf 2).

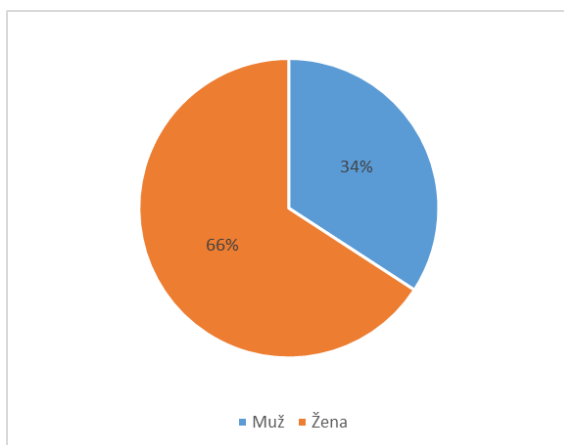


Graf 1: Počty vyšetření sérologických markerů za rok 2019



Graf 2: Četnost pozitivních sérologických nálezů na rok 2019

Z 9 755 vyšetřených pacientů bylo 6 419 žen a 3 336 mužů, to odpovídá procentuálnímu zastoupení 66 % žen a 34 % mužů (graf 3).



Graf 3: Procentuální rozložení všech testovaných pacientů podle pohlaví

V tab. 5 vidíme porovnání výsledků jednotlivých markerů u mužů a žen. Nejvíce pozitivních nálezů u obou pohlaví bylo u stanovení protilátek anti-HBs IgG (muži 148 a ženy 422 z celkového množství 570 pozitivních nálezů), které se vyšetřují nejčastěji pro kontrolu hladiny ochranných protilátek po očkování.

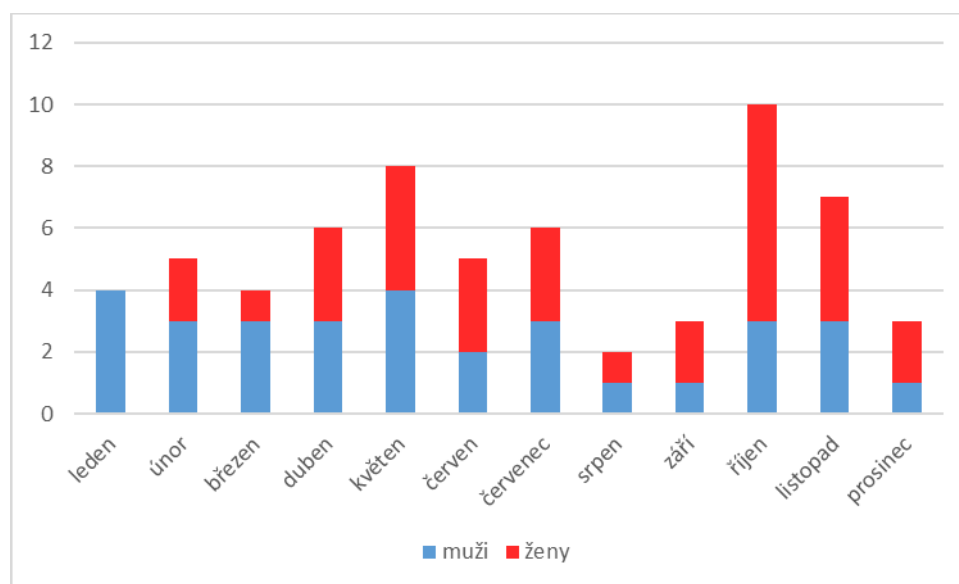
Tab. 5: Četnost sérologických nálezů podle pohlaví pacientů za rok 2019

	Muži		Ženy		Celkem	
	Pozitivní	Negativní	Pozitivní	Negativní	Pozitivní	Negativní
HBsAg	31	3131	32	6177	63	9308
anti HBs IgG	148	196	422	230	570	426
HBeAg	1	147	0	182	1	329
anti HBe IgG	21	128	30	147	51	275
anti HBc IgM	1	225	0	381	1	606
anti HBc Ig total	108	2063	91	2399	199	4462
HBsAg konfirmace	1	1	1	2	2	3

HBsAg je charakteristický marker akutní i chronické infekce. Z celkového počtu 9 371 vyšetření HBsAg bylo pozitivních 63 výsledků. Nejvíce HBsAg pozitivních výsledků bylo v říjnu a květnu (tab. 6). Z grafu 4 je viditelné, že HBV není sezónním onemocněním. Hodnoty kolísají v průběhu celého roku.

Tab. 6: Počet HBsAg pozitivních výsledků u mužů a žen v měsících roku 2019

	Muži	Ženy	Celkem
Leden	4	0	4
Únor	3	2	5
Březen	3	1	4
Duben	3	3	6
Květen	4	4	8
Červen	2	3	5
Červenec	3	3	6
Srpen	1	1	2
Září	1	2	3
Říjen	3	7	10
Listopad	3	4	7
Prosinec	1	2	3

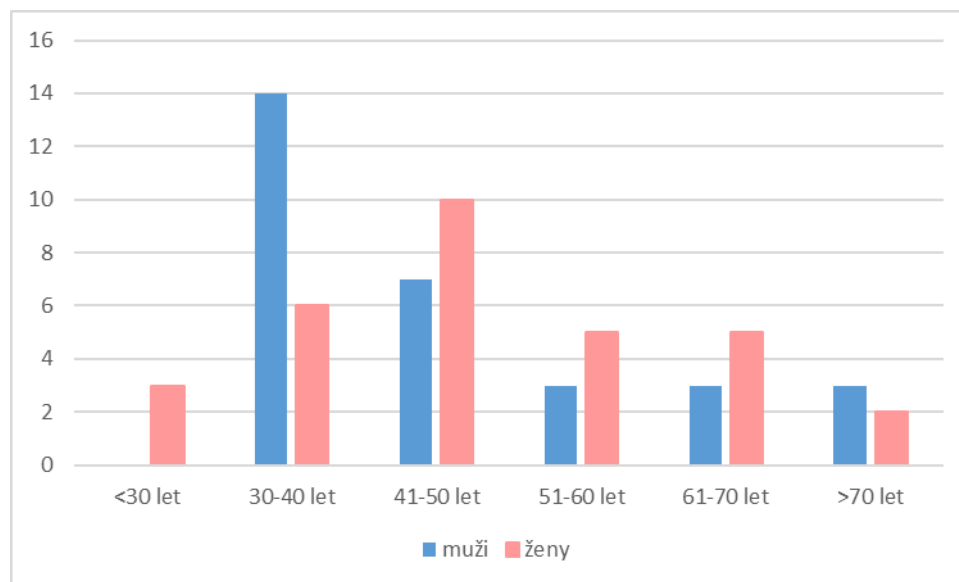


Graf 4: Porovnání HBsAg pozitivních výsledků u mužů a žen v měsících roku 2019

Celkem bylo 61 HBsAg pozitivních pacientů z toho 30 mužů a 31 žen. Nejvíce mužů bylo ve věku 30-40 let. U žen byl výskyt nejvyšší o kategorii výš, 41-50 let (tab. 7, graf 5). Modus (nejčastěji se vyskytující hodnota) je 40 let u mužů, 46 let u žen. Nejnižší věk ze souboru HBsAg pozitivních je 30 let u mužů, 24 let u žen. Naopak nejvyšší věk je 90 let u mužů, 72 let u žen.

Tab. 7: Četnost HBsAg pozitivních pacientů v konkrétních věkových kategoriích

Věk	Muži	Ženy	Celkem
<30 let	0	3	3
30-40 let	13	6	19
41-50 let	7	10	17
51-60 let	3	5	8
61-70 let	3	5	8
>70 let	4	2	6

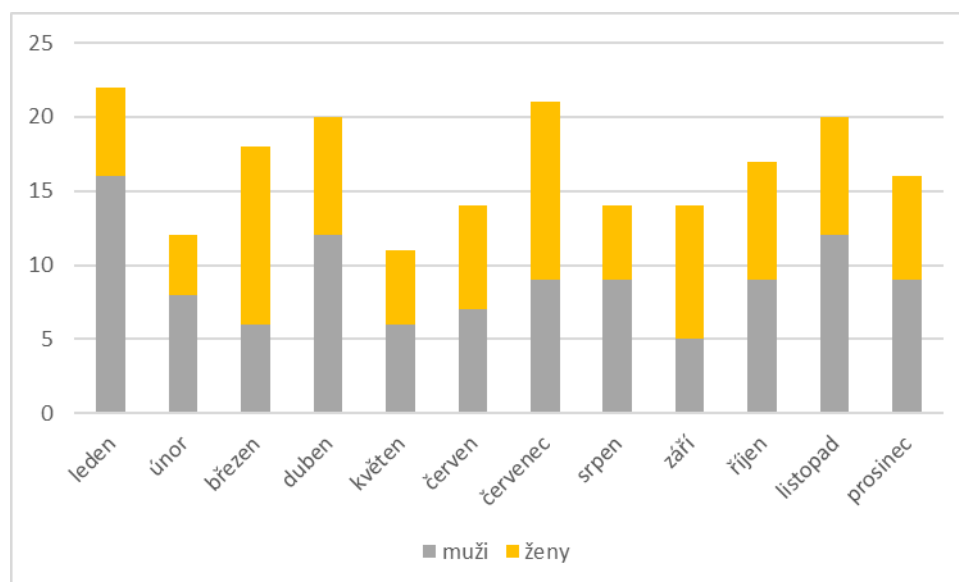


Graf 5: Porovnání HBsAg pozitivních pacientů v daných věkových kategoriích

Druhým nejčastějším pozitivním sérologickým markerem jsou protilátky anti-HBc Ig total (108 mužů a 91 žen), které jsou charakteristické pro chronickou nebo v minulosti prodělanou infekci (tab. 8). Nejvyšší počet pozitivních nálezů byl v lednu a červenci. Grafické porovnání mužů a žen v jednotlivých kalendářních měsících je zobrazeno v grafu 6.

Tab. 8: Počet anti-HBc Ig total pozitivních výsledků v měsících roku 2019

	Muži	Ženy	Celkem
Leden	16	6	22
Únor	8	4	12
Březen	6	12	18
Duben	12	8	20
Květen	6	5	11
Červen	7	7	14
Červenec	9	12	21
Srpen	9	5	14
Září	5	9	14
Říjen	9	8	17
Listopad	12	8	20
Prosinec	9	7	16

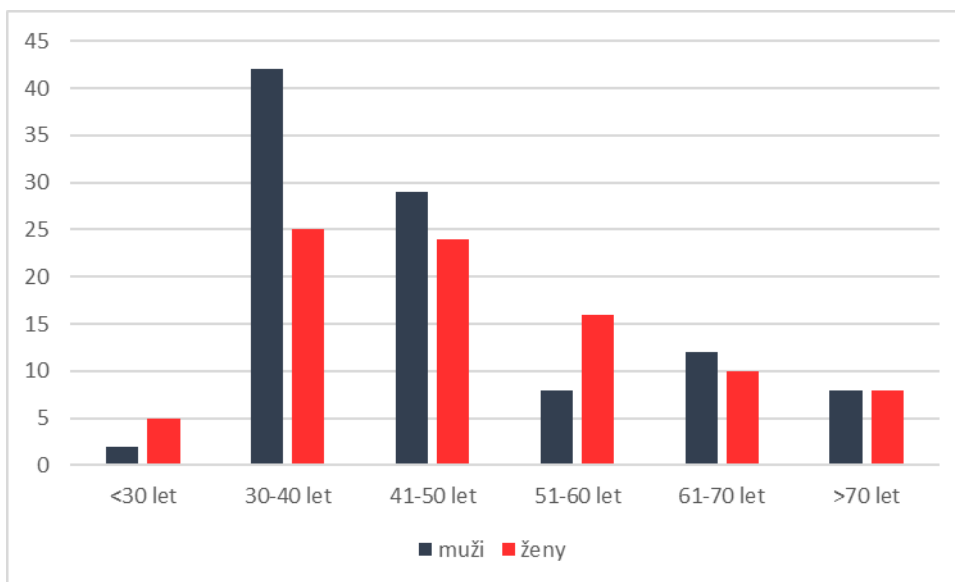


Graf 6: Počet pozitivních anti-HBc Ig total mužů a žen v měsících roku 2019

Nejpočetnější skupina anti-HBc Ig total pozitivních byla diagnostikována ve věkové kategorii 30-40 let (tab. 9, graf 7). Nejčastěji se vyskytující věk u mužů je 38 let, u žen 46 let. Medián u mužů je 42 let, u žen 46 let. Nejnižší věk byl 27 let u mužů a 1 rok u žen. Nejvyšší věk 84 let u mužů, 80 let u žen.

Tab. 9: Počet anti-HBc Ig total pozitivních pacientů podle věku

Věk	Muži	Ženy	Celkem
<30	2	5	7
30-40	42	25	67
41-50	29	24	53
51-60	8	16	24
61-70	12	10	22
>70	8	8	16



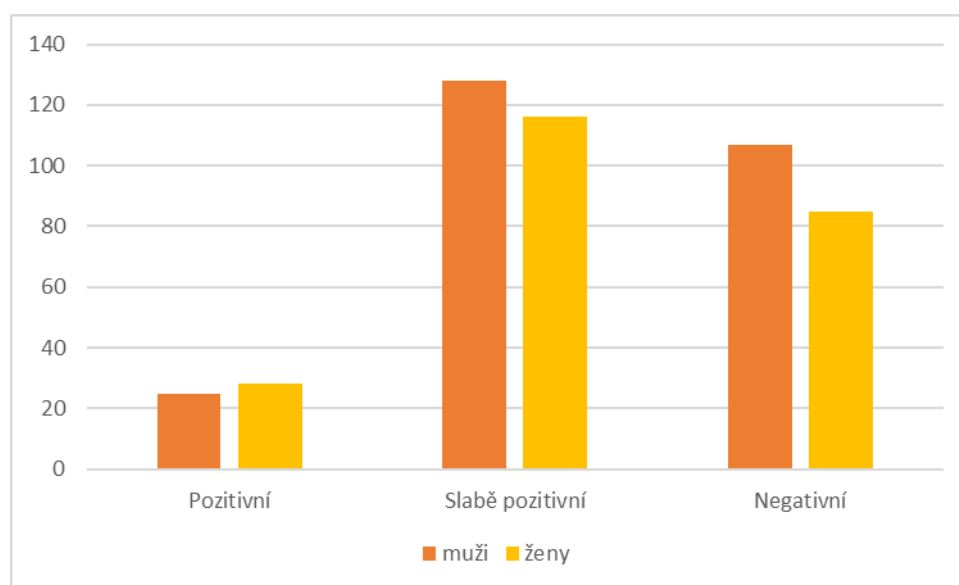
Graf 7: Věkové rozložení anti-HBc Ig total pozitivních pacientů

5.2 HBV DNA

Z celkového počtu 489 vyšetření HBV DNA za rok 2019 bylo 53 pozitivních, 244 slabě pozitivních a 192 negativních výsledků (tab. 10). Vyšetřovaných pacientů bylo 246 z toho 125 mužů a 121 žen. Někteří pacienti jsou vyšetřováni víckrát během roku. Jedná se většinou o chronicky infikované pacienty, u kterých se sleduje průběh infekce či účinnost léčby. Z grafu 8 vidíme, že zastoupení mužů a žen je zhruba podobné.

Tab. 10: Četnost nálezů HBV DNA podle pohlaví pacientů za rok 2019

	Pozitivní	Slabě pozitivní	Negativní
Muži	25	128	107
Ženy	28	116	85
Celkem	53	244	192

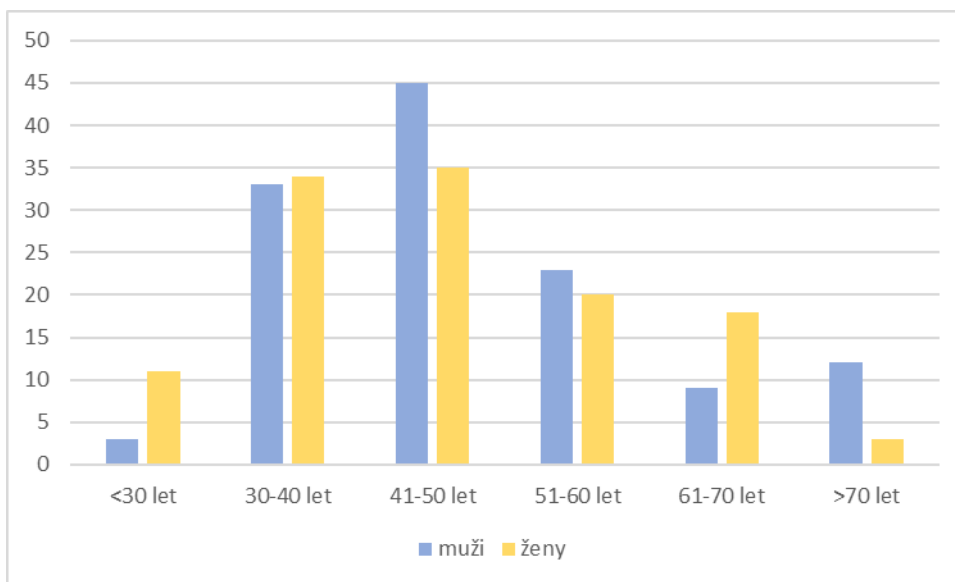


Graf 8: Porovnání výsledků vyšetření HBV DNA u mužů a žen za rok 2019

Z 246 HBV DNA pozitivních pacientů bylo nejvíce ve věku 41-50 let (tab. 11, graf 9). Nejčastější věk u mužů byl 49 let, u žen 39 let. Medián u mužů byl 46 let, u žen 44 let. Nejnižší věk u mužů byl 19 let, u žen 3 roky. Nejvyšší věk byl u mužů 90 let, u žen 86 let.

Tab. 11: Počet HBV DNA pozitivních pacientů podle věkových kategorií

Věk	Muži	Ženy	Celkem
<30 let	3	11	14
30-40 let	33	34	67
41-50 let	45	35	80
51-60 let	23	20	43
61-70 let	9	18	27
>70 let	12	3	15



Graf 9: Věkové rozložení HBV DNA pozitivních pacientů

6. Diskuze

Za rok 2019 bylo v naší laboratoři provedeno 16 296 vyšetření sérologických markerů a 489 vyšetření HBV DNA. Vyšetřeno bylo celkem 9 755 pacientů. Nejvíce vyšetřovaným markerem je HBsAg, který je jedním z markerů probíhající infekce virem hepatitidy typu B. Vyšetření HBsAg je zákonnou součástí předoperačních vyšetření a screeningu v těhotenství. Záchyt aktivní infekce může ztížit mutace viru v genu S, který může způsobit nižší reaktivitu HBsAg v komerčních testech.

První hypotéza zněla, že podíl mužů a žen pozitivních na HBsAg bude přibližně vyrovnaný. Celkem bylo 61 HBsAg pozitivních pacientů z toho 30 mužů a 31 žen. Hypotéza byla potvrzena. Podle Stránského (2001) byla prevalence HBsAg v naší populaci na počátku 80. let 0,5-1,5 %. Záchyt HBsAg pozitivních pacientů v naší laboratoři za rok 2019 činil 0,67 %.

Druhou hypotézou bylo, že nejvyšší četnost positivity ze sérologických markerů infekce, (mimo postvakcinační protilátky anti-HBs) bude vykazovat anti-HBc Ig total. Pacientů pozitivních na anti-HBc Ig total, tzn. pacientů, kteří byli v průběhu života infikováni virem hepatitidy B, bylo 189 z toho bylo 53 % mužů a 47 % žen. Nejpočetnější věkovou kategorií anti-HBc Ig total pozitivních pacientů tvořila skupina 30-40 let, druhou nejpočetnější byla skupina 40-50 let. I tato hypotéza byla potvrzena. Podle Stránského (2001) je poměr infikovaných mužů a žen 1,5-2 : 1. Z našich výsledků vyplývá, že počty infikovaných mužů a žen jsou téměř vyrovnané. Avšak vzorek z naší laboratoře není reprezentativní, výsledky není možné zobecnit.

Virus se přenáší zejména krví a pohlavním stykem, proto byl výskyt mezi mladými aktivními lidmi očekáván. Výjimku tvořila roční pacientka, která se pravděpodobně nakazila od matky. U starších pacientů se často jedná o náhodný nález při předoperačním vyšetření.

Anti-Hbs byl jediný marker z vyšetřovaného souboru, u kterého převažoval počet pozitivních nálezů protilátek anti-HBs nad počtem negativních (tab. 5). Většinu z toho tvoří postvakcinační protilátky. To potvrzuje i diagnóza Z000 (celkové lékařské vyšetření, prohlídka), která byla u vyšetření anti-HBs nejčastější. U zdravotnických pracovníků by se měla pravidelně kontrolovat hladina protilátek anti-HBs. Za ochrannou

se považuje hladina nad 10 IU/ml. Pokud zdravotník nemá dostatečnou hladinu protilátek, měl by se nechat přeočkovat 4., případně i 5. očkovací dávkou.

Vyšší počet HBV DNA pozitivních nálezů lze vysvětlit tím, že se HBV DNA většinou vyšetřuje u pacientů s již potvrzeným pozitivním sérologickým nálezem a u léčených pacientů ke sledování účinnosti léčby antivirotiky. Potvrzuje to i diagnóza B181 (Chronická virová hepatitida B bez Delta agens), která byla uvedena na více než polovině žádanek k vyšetření HBV DNA. Naše žádanka obsahuje i možnost „V případě positivity vyšetřit HBV DNA“. Neopomenutelná je i cena vyšetření, která je vyšší než při stanovení sérologických markerů.

Při interpretaci výsledků je nutné dbát na klinický stav pacienta. Ze samotných výsledků sérologických markerů není jednoduché přesně určit fázi onemocnění. Tabulková schémata jsou dobrým pomocníkem, avšak pouze teoretickým. Každý pacient je jedinečný a v praxi se objevují případy, které je obtížné zařadit do tabulkových schémat a učebnicových příkladů.

7. Závěr

Cílem mé bakalářské práce bylo seznámit s problematikou onemocnění virové hepatitidy typu B a její současnou laboratorní diagnostikou. V teoretické části byl popsán virus hepatitidy typu B, jeho stavba, životní cyklus, onemocnění způsobené tímto virem a možnosti laboratorní diagnostiky. Praktická část práce se soustředí na stanovení markerů hepatitidy B pomocí elektrochemiluminiscenční imunoanalýzy a kvantifikaci virové DNA pomocí real time PCR souboru pacientů z laboratoře infekční sérologie a virologie společnosti VIDIA-DIAGNOSTIKA spol. s r.o. za rok 2019. Porovnála jsem všechna vyšetření se zaměřením na pozitivní nálezy HBsAg a anti-HBc Ig total. Zhodnotila jsem výskyt vzhledem k pohlaví a věku pacientů. Vyslovené hypotézy byly potvrzeny.

Hepatitida typu B je vážné onemocnění, které s sebou nese riziko rozvoje jaterních komplikací a hepatocelulárního karcinomu a každý zdravotník by měl mít alespoň základní poznatky o tomto onemocnění. Možnosti laboratorní diagnostiky tohoto onemocnění jsou v současné době na velice dobré úrovni. Bohužel, hlavně kvůli častému inaparentnímu průběhu, se onemocnění obvykle diagnostikuje spíše během screeningového vyšetření před operacemi, během těhotenství, při asistované reprodukci atd. nežli v rámci diferenciální diagnostiky. Tento fakt dokazuje, že důležitost screeningových vyšetření je velice vysoká.

8. Seznam citované literatury

1. BELLONI, L. et al., 2009. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106(47):19975–19979, doi: 10.1073/pnas.0908365106.
2. BLUMBERG, B. et al., 1977. Australia antigen and the biology of hepatitis B. *Science*. 197(4298), 17-25, doi: 10.1126/science.325649.
3. BOCK, C.T. et al., 2001. Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *Journal of molecular biology*. 307(1): 183–196, doi:10.1006/jmbi.2001.4481.
4. BRUSS V., 2004. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus research*. 106(2):199–209, doi: 10.1016/j.virusres.2004.08.016.
5. ELLER, C. et al., 2018. The functional role of sodium taurocholate cotransporting polypeptide NTCP in the life cycle of hepatitis B, C and D viruses. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 75(21):3895-3905, doi:10.1007/s00018-018-2892-y.
6. HUANG, H.C. et al., 2012. Entry of hepatitis B virus into immortalized human primary hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *Journal of virology*. 86(17):9443–9453, doi: 10.1128/jvi.00873-12.
7. HUSA, P. et al., 2017. Diagnosis and Therapy of Hepatitis B Virus Infection – Czech National Guidelines. *Gastroent Hepatol*. 71(5): 419–437, doi:10.14735/amgh2017419.
8. KOČÁREK, E., 2007. *Molekulární biologie v medicíně*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně. ISBN 978-80-7013-450-4.
9. KOOLMAN, J., RÖHM K.-H., 2012. Barevný atlas biochemie. 4. vydání (1.české vydání). Praha: Grada. 512 s. ISBN: 978-80-247-2977-0.
10. KREKULOVÁ, L., ŘEHÁK, V., 2002. *Virové hepatitidy*. 2.vydání. Praha: Triton. 168 s. ISBN 80-7254-218-4.
11. Laboratorní příručka Oddělení klinické biochemie, 2019. [online]. Thomayerova nemocnice. [cit. 2020-05-03]. Dostupné z: <http://www.ftn.cz/upload/ftn/Kliniky/Biochemie/prirucka/HVEZDAAADM.htm>
12. LAMONTAGNE, J.R. et al., 2016. Hepatitis B virus molecular biology and pathogenesis. *Hepatoma Research*. 2(7), 163, doi:10.20517/2394-5079.2016.05.
13. LI, H.C. et al., 2010. Nuclear export and import of human hepatitis B virus capsid protein and particles. *PLoS pathogens*. 6(10):e1001162, doi: 10.1371/journal.ppat.1001162.

14. LOCARNINI S. et al., 2013. Possible origins and evolution of the hepatitis B virus (HBV). *Seminars in Cancer Biology*. 23(6), 561-575, doi: 10.1016/j.semcancer.2013.08.006.
15. LUCIFORA J. et al., 2011. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *Journal of Hepatology*. 55(5), 996-1003, doi: 10.1016/j.jhep.2011.02.015.
16. Metodický list Elecsys anti-HBc IgG, 2019. [online]. Roche diagnostics. [cit. 2020-05-03]. Dostupné z: https://pim-eservices.roche.com/eLD_SF/cz/cs/Documents/GetDocument?documentId=777f58b9-4886-e911-f2b5-00215a9b3428
17. Metodický list Elecsys anti-HBc IgM, 2019. [online]. Roche diagnostics. [cit. 2020-05-03]. Dostupné z: https://pim-eservices.roche.com/eLD_SF/cz/cs/Documents/GetDocument?documentId=e00036cd-49f7-e811-edbb-00215a9b3428
18. Metodický list Elecsys anti-HBe, 2019. [online]. Roche diagnostics. [cit. 2020-05-03]. Dostupné z: https://pim-eservices.roche.com/eLD_SF/cz/cs/Documents/GetDocument?documentId=0392497a-25f1-e911-f890-005056a772fd
19. Metodický list Elecsys anti-HBs, 2020. [online]. Roche diagnostics. [cit. 2020-05-03]. Dostupné z: https://pim-eservices.roche.com/eLD_SF/cz/cs/Documents/GetDocument?documentId=61fc4851-4483-ea11-fc90-005056a71a5d
20. Metodický list Elecsys HBeAg, 2019. [online]. Roche diagnostics. [cit. 2020-05-03]. Dostupné z: https://pim-eservices.roche.com/eLD_SF/cz/cs/Documents/GetDocument?documentId=279d876a-2cc5-e911-f690-005056a772fd
21. Metodický list Elecsys HBsAg Confirmatory Test, 2020. [online]. Roche diagnostics. [cit. 2020-05-03]. Dostupné z: https://pim-eservices.roche.com/eLD_SF/cz/cs/Documents/GetDocument?documentId=886d5051-cf83-ea11-fc90-005056a71a5d
22. Metodický list Elecsys HBsAg, 2020. [online]. Roche diagnostics. [cit. 2020-05-03]. Dostupné z: https://pim-eservices.roche.com/eLD_SF/cz/cs/Documents/GetDocument?documentId=4b0139e2-2b7f-ea11-fa90-005056a772fd
23. Metodický list Kvantitativní test nukleových kyselin pro použití na systému cobas® 4800, 2019. [online]. Roche diagnostics. [cit. 2020-05-18]. Dostupné z: https://pim-eservices.roche.com/eLD_SF/cz/cs/Documents/GetDocument?documentId=00d15833-ea1f-e911-a49d-00215a9b3428
24. MIAO, W., 2008. Electrogenenerated Chemiluminescence and Its Biorelated Applications. *Chemical Reviews*, 108(7), 2506-2553. doi: 10.1021/cr068083a.

25. Novotvary 2016, 2016. [online]. ÚZIS. [cit. 2020-05-24].
Dostupné z: <https://www.uzis.cz/sites/default/files/knihovna/novotvary2016.pdf>
26. PARASKEVIS, D. et al., 2013. Dating the Origin and Dispersal of Hepatitis B Virus Infection in Humans and Primates. *Hepatology*. 57(3), 908-916, doi: 10.1002/hep.26079.
27. RACEK, J., 2006. *Klinická biochemie*. 2. vydání. Praha: Galén. 330 s. ISBN 80-7262-324-9.
28. SEEGER, C. et al., 2015. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology*. 479–480C: 672–686, doi: 10.1016/j.virol.2015.02.031.
29. SHERLOCK, S., DOOLEY, J., 2002. *Diseases of the Liver and Biliary System*. 11. issue. Blackwell Science. 704 p. ISBN 80-86703-00-2.
30. SCHNEIDERKA, P. et al., 2004. *Kapitoly z klinické biochemie*. 2. vydání. Praha: Karolinum, 365 s. ISBN 80-246-0678-X.
31. Souhrn údajů o přípravku Engerix, 2014. [online]. SÚKL. [cit. 2020-01-01].
Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=SPC70999.pdf&type=spc&as=engerix-b-20-mcg-spc>
32. Souhrn údajů o přípravku Fendrix, 2009. [online]. SÚKL. [cit. 2020-05-25].
Dostupné z: <https://www.vakcinace.eu/data/files/vakciny/fendrix-spc.pdf>
33. Souhrn údajů o přípravku Infanrix hexa, 2010. [online]. SÚKL. [cit. 2020-05-25].
Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/infanrix-hexa-epar-product-information_cs.pdf
34. STRÁNSKÝ J. Virová hepatitida B a její klinický význam. 2001. Praha: Grada Publishing. 204 s. ISBN 80-247-0243-6.
35. SUH, A. et al., 2013. The genome of a Mesozoic paleovirus reveals the evolution of hepatitis B viruses. *Nature Communications*. 4(1), doi: 10.1038/ncomms2798.
36. SUMMERS, J. et al., 1990. Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification. *Journal of Virology*. 64 (6), 2819–2824.
37. VOTAVA, M. a kol., 2010. *Lékařská mikrobiologie – vyšetřovací metody*. Brno: Neptun. 495 s. ISBN 978-80-86850-04-8.
38. VOTAVA, M., 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
39. ZIMA, T., 2007. *Laboratorní diagnostika*. 2. vydání. Praha: Galén. 906 s. ISBN 978-80-246-1423-6.

9. Seznam obrázků a tabulek

Obr. 1: Serologický průběh akutní hepatitidy B u imunokompetentního pacienta (Stránský, 2001).....	16
Obr. 2: Serologický průběh chronické infekce HBV (Stránský, 2001).....	17
Obr. 3: Interpretace některých nálezů v krvi při infekci HBV (Votava, 2010).....	20
Obr. 4: Analyzátor cobas® e601 firmy ROCHE (Zdroj vlastní).....	28
Obr. 5: Reagenční kit HBsAg s kalibrátory (Zdroj: https://www.biolab-srl.com/products/electsys-hbsag-2-gen-calibrator/).....	28
Obr. 6: Připravený stojánek s patientskými vzorky (Zdroj vlastní).....	28
Obr. 7: cobas® x480 (Zdroj: Uživatelská příručka k systému cobas® 4800).....	31
Obr. 8: cobas® z480 (Zdroj: Uživatelská příručka k systému cobas® 4800).....	32
Graf 1: Počty vyšetření sérologických markerů za rok 2019.....	36
Graf 2: Četnost pozitivních sérologických nálezů na rok 2019.....	37
Graf 3: Procentuální rozložení všech testovaných pacientů podle pohlaví.....	37
Graf 4: Porovnání HBsAg pozitivních výsledků u mužů a žen v měsících roku 2019 ..	39
Graf 5: Porovnání HBsAg pozitivních pacientů v daných věkových kategoriích.....	40
Graf 6: Počet pozitivních anti-HBc Ig total mužů a žen v měsících roku 2019.....	41
Graf 7: Věkové rozložení anti-HBc Ig total pozitivních pacientů.....	42
Graf 8: Porovnání výsledků vyšetření HBV DNA u mužů a žen za rok 2019.....	43
Graf 9: Věkové rozložení HBV DNA pozitivních pacientů.....	44
Tab. 1: Hodnocení výsledků ECLIA metody.....	30
Tab. 2: Hodnocení výsledků anti-HBs protilátek.....	30
Tab. 3: Hodnocení výsledku HBsAg konfirmace.....	30
Tab. 4: Interpretace výsledků kvantifikace HBV DNA.....	35
Tab. 5: Četnost sérologických nálezů podle pohlaví pacientů za rok 2019.....	38
Tab. 6: Počet HBsAg pozitivních výsledků u mužů a žen v měsících roku 2019.....	39
Tab. 7: Četnost HBsAg pozitivních pacientů v konkrétních věkových kategoriích.....	40
Tab. 8: Počet anti-HBc Ig total pozitivních výsledků v měsících roku 2019.....	41
Tab. 9: Počet anti-HBc Ig total pozitivních pacientů podle věku.....	42
Tab. 10: Četnost nálezů HBV DNA podle pohlaví pacientů za rok 2019.....	43
Tab. 11: Počet HBV DNA pozitivních pacientů podle věkových kategoriích.....	44

10. Seznam zkratek

HBV – Hepatitis B Virus

HBsAg – Hepatitis B surface antigen (povrchový antigen)

S – small

M – middle

L – large

HBcAg – Hepatitis B core antigen

HBeAg – Hepatitis B envelope antigen

DNA – deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)

RNA – ribonucleic acid (ribonukleová kyselina)

DHBV – Duck hepatitis B virus

HHBV – Heron hepatitis B virus

RGHV – Ross's goose hepatitis B virus

CHBV – Crane hepatitis B virus

STHBV – Stork hepatitis B virus

PHBV – Parrot hepatitis B virus

ChHBV – Chimpanzee hepatitis B virus

GoHBV – Gorilla hepatitis B virus

OuHBV – Orangutan hepatitis B virus

GiHBV – Gibon hepatitis B virus

WMHBV – Woolly monkey hepatitis B virus

WHV – Woodchuck hepatitis virus

GSHV – Ground squirrel hepatitis virus

ASHV – Arctic ground squirrel hepatitis B virus

BtHV – Bat hepatitis B virus

ORF – open reading frame (otevřený čtecí rámeček)

rcDNA – relaxed closed DNA

cccDNA – covalently closed circular DNA

dsDNA – double-stranded linear DNA

rDNA – rekombinantní DNA

pgRNA – pregenomic RNA

mRNA – messenger RNA

ER – endoplasmatické retikulum

SVP – subviral particles
CTD – C-terminus domain
ARD – arginin-rich domain
TAP – transporter associated with antigen processing
NTCP – sodium-taurocholate co-transporting polypeptide
HDV – hepatitis D virus, delta virus
HCV – hepatitis C virus
Tc-lymfocyty – cytotoxické T-lymfocyty
NK – natural killer
AST – aspartátaminotransferáza
ALT – alaninaminotransferáza
GMD – glutamátdehydrogenáza
PCR – polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
ECLIA – electrochemiluminescent immunoassay (elektrochemiluminiscenční imunoanalýza)
COI – cut-off index
SDS – sodium dodecylsulfate (dodecylsulfát sodný)
EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid (kyselina etylendiaminotetraoctová)
HCC – hepatocellular carcinoma (hepatocelulární karcinom)
HBIG – hepatitis B immune globulin (protilátka proti hepatidě B)