

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Michaela Kališová

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Michaela Kališová

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**ZMĚNY ZASTOUPENÍ POVRCHOVÝCH ZNAKŮ T-
LYMFOCYTŮ U HIV POZITIVNÍCH PACIENTŮ**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Bc. Tomáš Vlas

PLZEŇ 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 25. 5. 2023

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Kališová Michaela

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Změny zastoupení povrchových znaků T-lymfocytů u HIV pozitivních pacientů

Vedoucí práce: Ing. Bc. Tomáš Vlas

Počet stran – číslované: 49

Počet stran – nečíslované: 23

Počet příloh: 0

Počet titulů použité literatury: 72

Klíčová slova: HIV, T-lymfocyty, průtoková cytometrie, imunofenotypizace

Souhrn:

Bakalářská práce je zaměřena na sledování změn zastoupení T-lymfocytů v průběhu času u HIV pozitivních pacientů. Na základě dostupných dat z průtokového cytometru se graficky znázornily změny v zastoupení CD3+, CD4+ a CD8+ lymfocytů u 10 vybraných pacientů. Výsledky pozorování potvrzují, že nejméně změn dochází v počtu CD3+ lymfocytů, zatímco největší pokles je sledován u CD4+ lymfocytů a největší nárůst u CD8+ lymfocytů. Vlivem antiretrovirové terapie dochází k normalizaci hodnot nejdříve u pacientů diagnostikovaných v primární infekci, zatímco pacienti diagnostikovaní v chronické infekci mají mnohem delší dobu trvání léčby.

Abstract

Surname and name: Kališová Michaela

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Changes in T-lymphocytes markers in HIV positive patients

Consultant: Ing. Bc. Tomáš Vlas

Number of pages – numbered: 49

Number of pages – unnumbered: 23

Number of appendices: 0

Number of literature items used: 72

Keywords: HIV, T-lymphocytes, flow cytometry, imunophenotyping

Summary:

The bachelor thesis is focused on monitoring changes in the count of T-lymphocytes over time in HIV-positive patients. The changes of CD3+, CD4+, and CD8+ lymphocytes in 10 selected patients are graphically processed from available flow cytometry data. The results of the observation confirm that the least changes occur in the count of CD3+ lymphocytes, while the largest decrease occurs in the count of CD4+ lymphocytes and the largest increase is observed in CD8+ lymphocytes. With antiretroviral therapy, initial normalization of values is observed first in patients diagnosed during the primary infection, while patients diagnosed during the chronic infection require a much longer duration of therapy.

Předmluva

Bakalářská práce byla napsána z důvodu mého zájmu o HIV, jakožto o onemocnění, které v minulosti mělo a stále má bez adekvátní léčby fatální následky na lidský organismus. S vývojem farmaceutických prostředků, které jsou stále na vzestupu, se může v dnešní době nemocný jedinec dožít vysokého věku. Antiretrovirovou léčbou lze virová replikace inhibovat natolik, že vir není detekovatelný komerčně dostupnými testy metodou PCR. Ačkoliv jde o velice závažné a zatím nevyléčitelné onemocnění, prevenci a edukaci velká část populace podceňuje.

Poděkování

Děkuji panu Ing. Bc. Tomášovi Vlasovi za odborné vedení práce, poskytování rad a materiálních podkladů. Dále děkuji panu Doc. MUDr. Daliborovi Sedláčkovi, CSc. za zodpovězení otázek ke kazuistikám. V neposlední řadě chci poděkovat své rodině, přátelům a příteli za podporu po celou dobu psaní této práce.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ	11
SEZNAM OBRÁZKŮ	12
SEZNAM TABULEK	13
SEZNAM ZKRATEK	14
ÚVOD.....	17
TEORETICKÁ ČÁST	18
1 HIV	18
1.1 Definice HIV.....	18
1.2 Historie.....	18
1.3 Původ	19
1.4 Struktura viru	20
1.5 Přenos.....	21
1.6 Patofyziologie / Životní cyklus HIV.....	22
1.7 Klinický obraz.....	24
1.7.1 Fáze A, asymptomatické období	27
1.7.2 Fáze B, symptomatické stádium.....	28
1.7.3 Fáze C, AIDS.....	28
2 DIAGNOSTIKA HIV	29
2.1 Enzymoimunoanalýza, EIA	30
2.2 Western blot, WB	31
2.3 Polymerázová řetězová reakce, PCR.....	33
2.4 Průtoková cytometrie, FC	34
3 TERAPIE	36
3.1 Nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy, NRTI	37
3.2 Nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy, NNRTI	37
3.3 Proteázové inhibitory, PI	38
3.4 Inhibitory fúze, FI	38
3.5 Inhibitory integrázy, INSTI	38
3.6 Inhibitory vstupu, EI	39
PRAKTICKÁ ČÁST	40
4 CÍL A ÚKOLY PRÁCE	40
5 VÝZKUMNÉ OTÁZKY	41
6 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	42
7 METODIKA PRÁCE	43
7.1 Preanalytická fáze	43

7.2 Analytická fáze	43
8 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	46
8.1 Gatovací strategie	46
8.2 Interpretace výsledků	48
DISKUZE	59
ZÁVĚR.....	65
SEZNAM LITERATURY	17

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Monitorace pacienta č.1	48
Graf 2: Monitorace pacienta č.2	49
Graf 3: Monitorace pacienta č.3	50
Graf 4: Monitorace pacienta č.4	51
Graf 5: Monitorace pacienta č.5	52
Graf 6: Monitorace pacienta č.6	53
Graf 7: Monitorace pacienta č.7	54
Graf 8: Monitorace pacienta č.8	55
Graf 9: Hodnoty HLA-DR+ u pacienta č.8	55
Graf 10: Monitorace pacienta č.9	57
Graf 11: Monitorace pacienta č.10	58
Graf 12: Porovnání mediánu CD4/CD8 z této práce a čtyř různých studií.	62

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1.....	46
Obrázek 2.....	46
Obrázek 3.....	47
Obrázek 4.....	47
Obrázek 5.....	47

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Klasifikace infekce HIV dle CDC.....	25
Tabulka 2: Klasifikace klinického průběhu HIV infekce dle WHO	25
Tabulka 3: Klasifikace klinického průběhu HIV infekce dle CDC.....	26
Tabulka 4: Proteiny na Western blot stripu	32

SEZNAM ZKRATEK

μL.....	mikrolitr
°C	stupeň Celsia
Ab.....	protilátka, antibody
Ag.....	antigen
AIDS	syndrom získaného selhání imunity, acquired immune deficiency syndrome
ARS.....	akutní retrovirový syndrom
ART	antiretroviróvá terapie
AZT.....	zidovudine
cART.....	kombinovaná antiretroviróvá terapie, combination antiretroviral therapy
CCR5	C-C chemokinový receptor typu 5
CD	diferenciační skupiny, cluster of differentiation
CDC	centrum pro kontrolu a prevenci nemocí, centers for disease control and prevention
cDNA.....	komplementární DNA
CMV	cytomegalovirus
CRP	C-reaktivní protein
CXCR4.....	C-X-C chemokinový receptor typu 4
DNA.....	deoxyribonukleová kyselina
EDTA.....	kyselina ethylendiamintetraoctová
EI.....	inhibitory vstupu, entry inhibitors
EIA.....	enzymoimunoanalýza, enzyme immunoassay

ELISA enzyme-linked immunosorbent assay

env..... gen HIV viru kódující tvorbu virových obalů (envelope)

FC..... průtoková cytometrie, flow cytometry

FI..... inhibitory fúze, fusion inhibitors

FSc přední rozptyl, forwards scatter

gag..... gen HIV viru kódující tvorbu proteinů matrix, nukleokapsidy
a kapsid (group antigen)

gp glykoprotein

GRID..... imunodeficit homosexuálů, gay-related immune deficiency

Hb..... hemoglobin

HIV virus lidské imunitní nedostatečnosti, human immunodeficiency virus

HLA hlavní histokompatibilní komplex, human leukocyte antigen

Ig imunoglobulin

IL-1 β interleukin 1 β

INSTI..... inhibitory integrázy, integrase strand transfer inhibitors

kDa..... kilodalton

LTR..... dlouhá terminální repetice, long terminal repeat

mAb monoklonální protilátka, monoclonal antibody

MHC hlavní histokompatibilní komplex, major histocompatibility complex

ml mililitr

mRNA..... mediátorová RNA, messenger RNA

NNRTI..... nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy

NRL Národní referenční laboratoř

NRTI nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy

PCR polymerázová řetězová reakce, polymerase chain reaction

PGL perzistující generalizovaná lymfadenopatie

PI proteázové inhibitory, protease inhibitors

PML progresivní multifokální leukoencefalopatie

Pol gen HIV viru kódující enzymy viru (polymeráza)

RNA ribonukleová kyselina

RT reverzní transkriptáza

SFV opičí pěnnotvorný vir

SIV virus opičí imunodeficiency, simian immunodeficiency virus

SSc boční rozptyl, side scatter

STLV8 opičí T-lymfotropní vir

TBC tuberkulóza

T_C cytotoxické T-lymfocyty

T_H pomocné T-lymfocyty

USA Spojené státy americké, United States of America

WB western blot

WHO Světová zdravotnická organizace, World Health Organization

ÚVOD

V bakalářské práci se zabýváme virem HIV a jeho dopadem na lidský organismus. HIV je lentivirus, který s postupem času způsobuje v těle infikovaného imunodeficit a může při absenci antiretrovirotik přejít do syndromu získaného selhání imunity, tedy AIDS. Ačkoliv je HIV celosvětovým problémem a infikovaných neustále přibývá, jeho prevenci lidé nedávají dostatečnou váhu.

Světová zdravotnická organizace na konci roku 2021 evidovala globálně přes 38 milionů HIV pozitivních osob, ale skutečný počet nakažených lze jen odhadovat z důvodu nedostatečného množství diagnostikovaných. Z psychologického hlediska by mohlo jít o strach lidí nechat se otestovat, ať už kvůli obavám předsudků, nebo kvůli obavám z možného odhalení skrytého zdravotního problému. V České republice se snaží zahnat stigma o preventivním testování například spolek Prague Pride, který každoročně společně s Českou společností AIDS umožňuje anonymní otestování zadarmo.

HIV pacienti potřebují komplexní péči, kterou zahrnuje kvalitní antiretrovirová léčba, péče o duševní zdraví, edukace, případně sociální podpora. Touto cestou mohou pacienti dosáhnout zlepšení zdravotního stavu a kvality života. Terapeutické možnosti jsou stále na vzestupu a díky nim lze potlačit virovou replikaci a alespoň částečně obnovit imunitní funkce. **Na světě se zatím povedlo zcela vyléčit čtyři lidi.**

Cílem práce je zkoumat změny v zastoupení T-lymfocytů u HIV pozitivních jedinců a tím porozumět, jak HIV infekce tuto populaci buněk v průběhu času ovlivňuje. Konkrétně sledujeme změny v subpopulacích CD3+, CD4+ a CD8+, které hrají klíčovou roli v imunitní odpovědi.

Teoretická část obecně popisuje HIV vir a jeho strukturu, historii, původ, patofyziologii, způsoby přenosu a klinický obraz onemocnění. Dále jsou zmíněné nejčastější diagnostické metody a jejich principy, které jsou posléze doplněny o současně nejužívanější terapeutická léčiva a principy jejich působení.

Praktická část obsahuje pracovní postup měření na průtokovém cytometru, gatovací strategii a následnou interpretaci výsledků. Výsledky této práce poskytují informace o imunitní odpovědi při onemocnění HIV a mohly by přispět k lepšímu porozumění imunopatogeneze tohoto viru.

TEORETICKÁ ČÁST

1 HIV

1.1 Definice HIV

HIV (Human Immunodeficiency Virus) neboli virus lidské imunitní nedostatečnosti je retrovir patřící do rodu lentivirů, který napadá imunitní systém. S oslabeným imunitním systémem je pro tělo obtížné bojovat s infekcemi a nemocemi. Pokud virus v těle přetrvává neléčený, vzniká velice závažné onemocnění AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome), neboli syndrom získaného selhání imunity. (1)

1.2 Historie

První informace signalizující nástup HIV byly zaznamenány na západním pobřeží USA v roce 1981, kdy docházelo k nárůstu případů pneumonií způsobených houbou *Pneumocystis jirovecii* u mladých homosexuálních mužů. S atypickou pneumonií byly hlášeny i další oportunní infekce a u některých případů i Kaposiho sarkom. Společným znakem pro tyto případy byla těžká imunodeficience velmi nízkým počtem CD4+ T-lymfocytů a s ní související lymfadenopatie. Další zprávy navyšujících se případů nemoci s obdobnými příznaky přicházely z východního pobřeží USA. Šíření vyústilo v celosvětovou pandemii, při které zemřela téměř polovina nakažených. (2)

Z rozvratu imunity byly podezírány nejen viry, ale jako další z možných variant byla zvažována také látka sloužící pro posílení erekce (Poppers). Protože se původně myslelo, že se nemoc šíří pouze mezi homosexuály, získala nemoc označení GRID (gay-related immune deficiency). A tak s narůstající incidencí začala narůstat i nenávisť k homosexuálům. Změna pohledu na způsob šíření přišla po zjištění, že nemoc nepostihuje jen muže, ale i ženy. Nemoc se totiž začala rychle šířit mezi přistěhovalci z Haiti, a to i mezi ženami. Další rizikovou skupinou byli injekční uživatelé drog a později i hemofilici, a to kvůli přenosu HIV krevní transfuzí. V roce 1982 získává onemocnění s neznámou etiologií název se zkratkou AIDS. (3) (4)

Dva výzkumné týmy z USA a Francie v letech 1983-1984 nezávisle na sobě objevily původce onemocnění AIDS, retrovirus lidské imunodeficience-1 (HIV-1). Do amerického týmu pod vedením Roberta Galla patřil i původem československý profesor Mikuláš Popovič, který vyvinul první test na detekci HIV. Francouzský tým pod vedením Luce

Montagniera v roce 1986 objevil příbuzný virus HIV-2. Mezi oběma týmy došlo k soupeření o prvenství, které bylo po setkání tehdejšího amerického prezidenta Ronalda Reagana a francouzského premiéra Jacquese Chiraca v roce 1987 prohlášeno za společné. Argument ovšem pokračoval až do roku 2002, kdy se oba týmy shodly, že HIV objevil francouzský tým jako první, ale že jeho role v AIDS byla první ukázána doktorem Gallem. Výzkum doktora Galla byl v roce 2008 už úplně zastřen, když Montagnier a jeho kolega dostali Nobelovu cenu za objev HIV. (4) (5)

V roce 1984 byla týmem doktora Galla uvedena velice spolehlivá sérologická metoda Western blot a o rok později byla schválena americkými úřady. Tímto započalo vyšetřování dárců krve. U nás se dárci začali testovat v roce 1987. (4) (6)

Roku 1987 Světová zdravotnická organizace (WHO) vydala program globální strategie proti AIDS. V té době se HIV dále nekontrolovaně šířilo a bylo nahlášeno přes 40 000 případů z 90 zemí. O dva roky později to bylo už 158 000 případů ze 149 zemí, avšak oficiální odhad činil 5-10 milionů nakažených. Na konci roku 2020 bylo evidováno 37,7 miliónů lidí žijících s HIV, z toho přes 2/3 (25,4 milionů) nemocných žilo na africkém kontinentě. (4) (7)

1.3 Původ

HIV-1 a HIV-2 jsou výsledkem několika na sobě nezávislých mezidruhových přenosů z primátů na člověka ve střední a západní Africe. Skupiny M, N, O a P z HIV-1 linie pochází alespoň ze čtyř mezidruhových přenosů. Kmeny SIVcpzPt, které daly vzniknout skupinám M a N, pocházejí z virové linie, která se nachází v šimpanzích čego (Pan troglodytes troglodytes) ve středním Kamerunu. SIVgor viry, příbuzné skupinám O a P, jsou přítomny v gorilách (Gorilla gorilla gorilla) v nížinách západního Kamerunu. Původním rezervoárem jsou ale šimpanzi. Mezitímco skupiny O, N a P zůstaly především v Kamerunu, skupina M se roznesla po celém světě a tvoří více jak 90% všech potvrzených případů. (8)

Podobně na tom jsou skupiny z HIV-2 linie, které zůstaly především v západní Africe. Skupiny A-I jsou výsledkem alespoň devíti přenosů viru SIVsmm nacházejícího se v mangabejích kouřových (Cercopithecus atys). (9) (8) (10)

K přenosu na člověka pravděpodobně došlo kontaktem s krví či jinými sekrety, a to při lovu a porcování masa primátů. Dále mohlo dojít k přenosu přes kousnutí či jiné zranění způsobené primáty. (11)

Rozbor masa primátů v Kamerunu odhalil, že je virem SIV infikováno cca 10% primátů. Z 69 rozpoznávaných druhů primátů v Africe je mezi nejméně 32 druhy rozšířena SIV infekce, což je téměř polovina. To znamená, že pro člověka není riziko pouze kontakt s šimpanzi čego, gorilami a mangabeji kouřovými, ale i kontakt s minimálně dalšími 29 druhy primátů. (11)

Nárůst četnosti lovu a souvisejících činností, ať už řeznictvím, prodáváním a uzením masa primátů nebo třeba jejich využívání jako domácích mazlíčků je přímo úměrné zvýšenému riziku přenosu retrovirů na lidi, a to nejen zmíněných SIV, ale také opičích T-lymfotropních virů (STLVs) a opičích pěnnotvorných virů (SFV). (12)

1.4 Struktura viru

Elektronomikroskopicky je morfologie HIV-1 a HIV-2 téměř stejná. Odlišnost je dána rozdílnou sekvencí RNA, která kóduje bílkoviny lišící se molekulovou hmotností. (4)

HIV je obalená sférická partikule o průměru asi 100 nm. Stejně jako ostatní lentiviry je virus tvořen lipidovou dvojrůstkou, která je původem z membrány hostitelské buňky. Povrchové glykoproteiny (gp120) jsou k povrchu ukotveny prostřednictvím transmembránového proteinu (gp41). Lipidová dvojrůstka dále obsahuje několik membránových proteinů odvozených z hostitelské buňky, a to včetně MHC (hlavní histokompatibilní komplex), aktinu a ubiquitinu. Na spodní straně membrány je uchycen matrix protein p17. Uvnitř je kónická kapsida, která je kryta proteinem p24. V kapsidě jsou uložena dvě identická pozitivní jednořetězcová vlákna RNA, která jsou stabilizována v ribonukleoproteinový komplex s nukleokapsidovým proteinem p7. (3) (13)

HIV se od ostatních retrovirů odlišuje vyšším počtem genů a jejich komplexními interakcemi. Genom je tvořen celkem devíti geny, třemi strukturními a šesti regulačními. Všechny retroviry obsahují stejné tři strukturní geny, které kódují strukturální proteiny a enzymy používané při replikaci. Jedná se o gag, pol a env. Gag gen řídí tvorbu proteinů p6, p7, p17 a p24. Pol gen zodpovídá za syntézu enzymů aktivních v replikaci, a to reverzní transkriptázy, integrázy a proteázy. Reverzní transkriptáza (p51 a p66) přepisuje genomovou RNA do DNA. Integráza (p32) začleňuje vzniklou DNA do chromozomu hostitelské buňky. Proteáza (p11) štěpí a tím aktivuje polyproteiny syntetizované podle gag a pol genů. Proteinový prekurzor Gp160, kódován env genem, se proteázou štěpí na menší molekuly Gp120 a Gp41. Mezi geny, které mají regulační funkci patří Rev, Tat, Nef, Vif, Vpr a Vpu. (3) (4) (14) (15)

1.5 Přenos

Epidemiologické studie provedené v letech 1981-1982 jako první indikovaly, že k přenosu HIV dochází sexuálně a při kontaktu s kontaminovanou krví. AIDS se v té době projevoval především u homosexuálních i bisexuálních mužů a injekčních uživatelů drog. Brzy poté se prokázal přenos i u heterosexuálních jedinců. Následující studie odhalily, že se k infekci mohou dostat příjemci transfuze a hemofilici, kteří získávají plnou krev či krevní deriváty. Dále začalo být zřejmé, že se virus přenáší z infikované matky na plod. Dominantním způsobem nákazy v České republice je dlouhodobě pohlavní styk. (4) (16) (17)

Epidemiologická data z celého světa dodnes tvrdí, že ke třem primárním způsobům patří sexuální kontakt, vystavení kontaminované krvi (zejména injekčním užíváním drog a transfuzí) a vertikální přenos z infikované matky na dítě. Zmíněné způsoby přenosu jsou dány koncentrací viru v různých tělních tekutinách. Nejvíce se ho nachází v krvi, spermatu, vaginálních sekretech, mateřském mléce a v mozkomíšním moku. Všechny tyto tekutiny, vyjma mozkomíšního moku, jsou relevantním zdrojem nákazy. V menších koncentracích se nachází i ve slinách a slzách, ty ovšem nejsou významným zdrojem vzhledem k obsahu HIV inhibujících složek a jen malého množství infekčního viru. (16) (18)

K transmisi viru z matky na dítě může dojít přímo *in utero* placentou, anebo při porodu, kdy je novorozenec vystaven krvi a sekretům matky. Hlavním faktorem ovlivňujícím přenos tímto způsobem je množství infekčních virů v tkáních matky (placenta, děloha, ale i plodová voda) v době porodu. Množství infikovaných makrofágů a T-lymfocytů v kostrum a mateřské mléce rovněž rozhoduje, zda k přenosu dojde. (16)

Efektivní prevencí před sexuálním přenosem je kondom. Dále bylo prokázáno, že mužská obřízka snižuje riziko nákazy u mužů až od 60%. Je to dané afinitou HIV k Langerhansovým buňkám, které jsou bohatě obsaženy na vnitřní straně předkožky. Naopak mezi faktory zvyšující pravděpodobnost nákazy patří vysoká virová nálož, kontakt s krví během styku (následek traumatu, menstruace), ulcerace na genitálu (herpes simplex, syfilis, chancroid) a celkově další sexuálně přenosné onemocnění. (16) (17) (19)

Za zmínku stojí rizika přenosu v populaci vězňů. Mezi osobami v nápravných zařízeních se infekční nemoci šíří mnohem více v porovnání se zbytkem populace. Příkladem může být prevalence sexuálně přenosných onemocnění jako jsou chlamydie. Ty se u vězňů vyskytují 18-50x více než u zbytku populace. Důvodem vyšší prevalence infekčních onemocnění je primárně injekční užívání drog, kdy se jedna jehla může dostat až mezi desítky

věznů. Studie provedená v roce 2014 odhalila, že za 5% nově zjištěných HIV infekcí v centrální Evropě stojí injekční užívání drog. K infekci může dojít i při tetování, kdy je velkým problémem opět nedostatek sterilních jehel. Výjimkou nejsou ani nechráněné homosexuální a heterosexuální aktivity mezi vězni. Dalším důvodem může být v některých zařízeních i sdílení kartáčků a žiletek. (18) (20)

1.6 Patofyziologie / Životní cyklus HIV

Cílem HIV jsou CD4⁺ pomocné T-lymfocyty (T_H) a další buňky nesoucí receptor CD4. Tento monomerní glykoprotein je detekovatelný na povrchu asi 60% T-lymfocytů, na T-buněčných prekurzorech v kostní dřeni a brzlíku, monocytech, makrofázích, eozinofilech, dendritických buňkách, mikroglíích a buňkách nervové soustavy. Infikovat ale mohou i B-lymfocyty prostřednictvím receptorů pro komplement nebo Fc receptorů. Na T-lymfocyty se váže pomocí ligandu gp120 na receptor CD4 a jako koreceptor využívá receptor pro chemokiny, a to buď CCR5 na makrofázích, nebo CXCR4 na CD4 lymfocytech. Ačkoliv je CD4 hlavní receptor pro fúzi viru, povrchové struktury CCR5 a CXCR4 jsou klíčové pro následný průnik do cílové buňky. K CCR5 mají afinitu především M-tropní kmeny HIV-1, atakující makrofágy v časně fázi infekce. K CXCR4 se připojují T-tropní kmeny HIV-1, zodpovědné za rychlejší průběhy onemocnění. Makrofágy mohou sloužit jako rezervoáry viru HIV-1. (4) (21) (22) (23)

Po průniku do cílové buňky dochází k oddělení glykoproteinových obalů a do buněčné cytoplazmy proniká nukleokapsida, z níž se uvolní RNA s navázanou reverzní transkriptázou. Působením reverzní transkriptázy dochází k přepisu RNA na provirovou dvouřetězcovou DNA s dlouhými terminálními repeticemi (LTR) na obou koncích. LTR obsahuje sekvence, které „zesilují“ replikaci nových virových částic. Při replikaci dochází k velkému počtu spontánních mutací, které mohou mít za důsledek rezistenci k určitým antiretrovirotikám. V jednom replikačním cyklu vzniká při reverzní transkripci v průměru k 1-10 chybám. DNA je dále transportována přes jaderné póry do jádra hostitelské buňky a posléze zabudována integrázou do genomu. Integrovaná virová DNA se označuje jako provirus. (4) (15) (21) (24)

Další fází je transkripce a translace. Během transkripce vzniká mRNA, která je z jádra transportována do endoplazmatického retikula, kde dochází k translaci na polypeptidy, ze kterých se v cytoplazmě tvoří nové virové částice a kompletují se. Proteáza dokončuje maturaci nových virů tím, že štěpí původní polypeptidový řetězec a vytváří tak proteiny p17,

p24 a funkční enzymy. Částice se po maturaci stávají infekční a uvolňují se pučením, čímž získávají obal z buněčné membrány hostitelské buňky a mohou napadat dosud neinfikované CD4+ buňky. V časně fázi infekce částice opouštějí buňku ve velkém množství. (4) (15) (21) (24)

Jakmile je provirální DNA v infikované buňce, nemůže být odstraněna jinak, než zničením samotné buňky. Replikace je pro buňky energeticky náročná, tudíž dochází k jejich postupnému vyčerpávání a lýze. K smrti hostitelské buňky může docházet i přes další různé mechanismy, například vlastním cytotoxickým účinkem CD8+ cytotoxických T-lymfocytů (T_C), přímým cytopatickým efektem, vznikem syncytií (obrovské mnohojaderné útvary vytvořené fúzí buněk), autoimunitními mechanismy, interakcí povrchových polyproteinů HIV s cílovou buňkou, apoptózou atd. (2)

Během prvních pár dní nákazy HIV dochází k latentní infekci CD4+ T-lymfocytů. Vir tak může dlouhodobě přežívat ve tkáních a rezervoárových orgánech v těle infikovaného. Během 2-4 týdnů se u 50-90% infikovaných objevuje soubor příznaků označovaných jako akutní retrovirový syndrom (ARS). V tomto období, trvajícím přibližně 1-2 týdny, je v plazmě a lymfatické tkáni detekovatelná vysoká hladina HIV RNA, jakožto výsledek extrémně vystupňované replikace HIV. Při hromadném infikování dosud intaktních CD4+ T-lymfocytů dochází k přechodnému poklesu jejich relativních i absolutních počtů. Po odeznění ARS syndromu dojde opět ke zvýšení počtu CD4+ T-lymfocytů v krvi, ale nedosáhne předchozích hodnot. Propuknutí infekce při masivní replikaci v CD4+ T-lymfocytech předchází době „klidu“, kdy dochází k replikaci hlavně v ostatních CD4+ buňkách. Z tohoto důvodu se HIV dlouho projevuje asymptomaticky. U neléčené osoby mohou v průběhu let případně měsíců poklesnout CD4+ T-lymfocyty na velmi nízkou, někdy až nulovou hodnotu, což se vyznačuje těžkým imunodeficitem a vysokou náchylností k oportunním infekcím, nádorům a jiným stavům asociovaných s HIV infekcí. Přibližně u 50% neléčených se do 10 let rozvine AIDS. (4) (21) (2)

Na mechanismus redukce CD4+ T-lymfocytů způsobených HIV infekcí dosavadní studie nevytvořily jednotný názor. Většina studií se domnívá, že je za progresivním poklesem CD4+ buněk apoptóza buněk po infikování HIV a lze jej využívat jako indikátor hodnocení účinku antiretrovirální léčby, a tak předcházet vzniku oportunních infekcí i smrti. (25)

1.7 Klinický obraz

Jak už bylo zmíněno, HIV je retrovirus, který se řadí do podskupiny lentivirů. Název vychází z latinského slova „pomalý“ (lentus), což charakterizuje dlouhou inkubační dobu nemoci. (26)

Progres onemocnění stojí na komplexní souhře biologických vlastností viru a imunitní odpovědi nemocného. Ovlivňuje ji spousta faktorů, počínaje genetickou výbavou infikovaného (např. hlavní histokompatibilní komplex MHC, u člověka HLA), celkovou anamnézou včetně přítomnosti jiných sexuálně přenosných nemocí, procesy stimulující imunitu (alergie) a faktory ovlivňující produkci cytokinů. Již probíhající infekce v těle nemocného (např. Chlamydia trachomatis, Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, hepatitida typu B) funguje jako koinfekce a může urychlit postup k imunodeficienci tím, že pomáhá v depleci CD4+ T-lymfocytů. Vývoj nemoci také ovlivňují faktory související s životním stylem infikovaného jako kouření, alkohol, drogy a stres. (14) (16)

Ačkoliv jsou si viry HIV-1 a HIV-2 velice podobné at' morfologií, cestami přenosu či cytopatogenitou *in vitro*, jejich hlavním rozdílem je to, že HIV-2 je méně patogenní a samotná infekce má další dobu latence, pomalejší progres k plně vyvinutému onemocnění, nižší titry virů a nižší pravděpodobnost přenosu. (27)

Klinické fáze můžeme klasifikovat dle Světové zdravotnické organizace (WHO) do 4 stádií, nebo dle Centra pro kontrolu a prevencí nemocí (CDC) ve Spojených státech amerických do 3 stádií. V odborné literatuře se primárně využívá klasifikace dle CDC, tudíž se v této práci zaměříme na ni. (4)

Klasifikační systém WHO byl vytvořen v roce 1990 a zaevidovaný v roce 2007. Je založený pouze na klinických aspektech onemocnění, což ho dělá využitelným zejména v chudších oblastech, kde je obtížně dostupné vyšetření hladiny CD4+ T-lymfocytů. Rozlišují se 4 stádia označená číslicemi 1-4 (viz tabulka č.2), kdy poslední fáze znamená přechod HIV infekce do AIDS. (4)

Systém dle CDC byl zhotoven v roce 1993 a dodnes je nejpoužívanějším systémem. Stádia jsou označená písmeny A, B, C a přiřazují se k nim číslice 1-3, čímž vzniká 9 různých kombinací (viz tabulka č.1). Písmena označují klinický stav pacienta (viz tabulka č.3), kdy poslední fáze opět znamená přechod do AIDS. Číslice vyjadřují laboratorní počet CD4+ T-lymfocytů, jakožto nejvíce destruovaných buněk během HIV infekce. (4)

Tabulka 1: Klasifikace infekce HIV dle CDC

Absolutní počet CD4+ T-lymfocytů (na mm ²)	Klinické skupiny		
	A	B	C
> 500	A1	B1	C1
200-499	A2	B2	C2
<200	A3	B3	C3

Zdroj: vlastní

Tabulka 2: Klasifikace klinického průběhu HIV infekce dle WHO

Klinická kategorie	Diagnóza	
1	akutní HIV infekce	
	asymptomatická HIV infekce	
	perzistující generalizovaná lymfadenopatie (PGL)	
2	jinak nevysvětlitelný středně významný váhový úbytek (o <10% původní hmotnosti)	
	rekurentní respirační infekce (sinusitida, faryngitida, tonzilitida, otitis media)	
	herpes zoster	
	angulární cheilitida	
	rekurentní vředy v dutině ústní	
	populární svědivé kožní léze	
	seboroická dermatitida	
	mykotické postižení nehtů	
	3	jinak nevysvětlitelný pokles tělesné hmotnosti (o >10% původní hmotnosti)
		jinak nevysvětlitelný chronický průjem trvající déle než 1 měsíc
jinak nevysvětlitelná zvýšená tělesná teplota trvající déle než 1 měsíc (>37,6 °C, setrvale nebo intermitentně)		
chronický soor v dutině ústní		
vlasatá leukoplakie v dutině ústní		
plicní forma tuberkulózy (TBC)		
těžší bakteriální infekce (např. pneumonie, artritida, osteomyelitida, sepse)		
akutní nekrotizující ulecrózní stomatitida, gingivitida či periodontitida		
jinak nevysvětlitelná anémie (Hb <80 g/L)		
jinak nevysvětlitelná neutropenie (<500 buněk/ μ L)		
4		mozková toxoplasmóza
	pneumocystová pneumonie	
	ezofageální kandidóza	
	kandidóza trachey, bronchů, či plic	
	cytomegalovirová infekce (retinitida nebo jiné orgány)	
	chronická infekce herpes simplex trvající déle než 1 měsíc nebo viscerální postižení	
	recidivující pneumonie (více než 2x za rok)	

	recidivující salmonelová sepe
	mimoplicní TBC
	diseminovaná infekce oportunními mykobakteriemi
	extrapulmonární kryptokokóza zahrnující meningitidu
	chronická kryptosporidióza
	chronická izosporóza
	diseminovaná kokcidiomykóza nebo histoplasmóza
	atypická diseminovaná leishmanióza
	Kaposiho sarkom
	maligní lymfom či primární lymfom mozku
	invazivní cervikální karcinom
	progresivní multifokální leukoencefalopatie (PML)
	HIV encefalopatie (AIDS demence)
	HIV wasting syndrome
	symptomatická s HIV-asociovaná neuropatie
	symptomatická s HIV-asociovaná kardiomyopatie

Zdroj: vlastní

Tabulka 3: Klasifikace klinického průběhu HIV infekce dle CDC

Klasifikace klinického průběhu HIV infekce dle CDC	
Klinická kategorie	Diagnóza
A	akutní HIV infekce
	asymptomatická HIV infekce
	perzistující generalizovaná lymfadenopatie (PGL)
B	orofaryngeální kandidóza
	kandidová vulvovaginitida (recidivující)
	orální leukoplakie
	bacilární angiomatóza
	lymfoidní intersticiální pneumonie
	herpes zoster (recidivující nebo na více dermatomech)
	horečka nebo průjem trvající déle než 1 měsíc
	trombocytopenická purpura
	listerióza (meningitida)
	cervikální dysplazie nebo karcinom <i>in situ</i>
	recidivující adnexitidy
	periferní neuropatie
C	mozková toxoplasmóza
	pneumocystová pneumonie
	ezofageální (plicní) kandidóza
	generalizovaná infekce CMV (cytomegalovirus) a retinitida
	generalizovaná (mukokutánní) infekce herpes simplex
	recidivující pneumonie (více než 2x za rok)
	recidivující salmonelová sepe
	TBC (i mimoplicní)
	diseminovaná infekce oportunními mykobakteriemi
extrapulmonární kryptokokóza zahrnující meningitidu	

	chronická kryptosporidióza
	diseminovaná histoplasmóza
	diseminovaná kokcidiomykóza
	chronická izosporóza
	Kaposiho sarkom
	maligní lymfom či primární lymfom mozku
	invazivní cervikální karcinom
	progresivní multifokální leukoencefalopatie (PML)
	HIV encefalopatie (AIDS demence)
	HIV wasting syndrome

Zdroj: vlastní

1.7.1 Fáze A, asymptomatické období

Tato kategorie zahrnuje tři klinické stavy, akutní HIV infekci (ARS), asymptomatickou HIV infekci a perzistující generalizovanou lymfadenopatii (PGL). ARS začíná obvykle během 2-4 týdnů po nakažení. Klinicky se projevuje přibližně u 70% infikovaných a nejčastěji se manifestuje jako febrilní stav doprovázený lymfadenitidou a tonzilofaryngitidou připomínající mononukleózu (mononucleosis-like syndrome), nebo chřipkovými příznaky (flu-like syndrome) s horečkami, dráždivým suchým kašlem, bolestmi kloubů a svalů. Příznaky nejsou natolik charakteristické, aby byly spojovány s HIV infekcí a mizí přibližně do dvou týdnů. U některých pacientů přetrvává lymfadenopatie. Absence nebo minimum příznaků v této fázi mohou značit příznivější postup onemocnění. Naopak, stavy s výrazně vysokou virémií a těžším průběhem jsou spojovány s rychlejším progresem HIV infekce do AIDS. V této fázi je největší risk přenosu HIV kvůli vysoké virémii. Předpokládá se, že 50% nově infikovaných je nakaženo od osob ve fázi A. (4) (21) (28)

V prvních třech týdnech, tedy při vrcholu replikace HIV, je laboratorně pozorovatelná leukopenie s lymfocytopenií, daná masivní deplecí CD4+ a CD8+ T-lymfocytů. Zvyšuje se procento neutrofilních tyčů. Při replikaci dochází k mutacím viru, které mohou zvýšit jeho virulenci a rezistenci k léčbě. Po třech týdnech dochází k trombocytopenii, neutropenii a k lymfocytóze s převahou CD8+ T-lymfocytů. Ireverzibilně se tak mění poměr CD4/CD8 lymfocytů, který i navzdory léčbě přetrvává inverzní. Přibližně u poloviny infikovaných jsou prokazatelné reaktivní lymfocyty a zvýšené CRP. Sedimentace erytrocytů bývá zvýšena. Rovněž bývají po dobu tří měsíců zvýšené jaterní aminotransferázy. Imunologické vyšetření prokazuje poruchu funkce B-lymfocytů *in vitro* a sníženou reakci na antigeny. V plazmě je detekovatelný antigen p24 a vysoká koncentrace HIV RNA. Později se tvoří specifické protilátky anti-HIV třídy IgM, poté i třídy IgG. V některých případech je lze prokázat ELISA metodou za dva týdny, spolehlivě do 6-12 týdnů. IgG v séru perzistují do konce života a jsou

dominantně se vyskytující třídou imunoglobulinů ve všech klinických fázích. Konfirmační testy se v České republice dělají pouze v Národní referenční laboratoři (NRL) pro HIV/AIDS v Praze, a to metodou western blot (WB). (21) (16) (17)

Hladina CD4+ T-lymfocytů se většinou vrací do téměř normálních hodnot 3-6 měsíců po ARS. S odezněním ARS nastupuje asymptomatické období, trvající obvykle 2-8 let, během něž se postupně opět snižuje počet CD4+ T-lymfocytů. V tomto období jsou zpravidla přítomné anti-HIV protilátky. U těhotných infikovaných dochází k vertikálnímu přenosu HIV na plod. (4) (16) (21)

1.7.2 Fáze B, symptomatické stádium

Fáze B se vyznačuje výskytem oportunních infekcí (viz tabulka č.3), podmíněných malým či středně velkým deficitem buněčné specifické imunity způsobeným kontinuální deplecí CD4+ T-lymfocytů, převážně T_{H1} subpopulací. Sice dochází k hyperprodukci IgG imunoglobulinů, ale proti HIV nemají neutralizační vliv kvůli četným mutacím na env genu pro obalové glykoproteiny HIV. (4) (21)

Některá onemocnění jsou příliš nespecifická, aby odhalila skrytou HIV infekci (např. trombocytopenie, horečky, průjmy), a některá naopak dokáží napovědět přítomnost viru (např. soor způsobený *Candidou*, recidivující herpes zoster). Část infikovaných i tuto fázi přejde asymptomaticky. (4)

1.7.3 Fáze C, AIDS

AIDS se u infikovaných objevuje přibližně do 8-10 let od nakažení virem HIV. Rozvoj některých oportunních infekcí nebo malignit (viz tabulka č.3) s absencí jakéhokoliv důvodu k jejich výskytu (např. transplantace; imunosupresivní chemoterapie) splňuje diagnostická kritéria pro AIDS. Mezi nejčastější oportunní infekci a zároveň nejfrekventovanější diagnostikovanou komplikací korelující s nástupem AIDS patří pneumocystová pneumonie (*Pneumocystis jirovecii*). Objevuje se přibližně u dvou třetin nakažených. Od běžně se vyskytujících infekcí plic se liší tím, že způsobuje oboustranné postižení plic a typicky nereaguje na léčbu antibiotiky. U obyvatel Haiti a Afriky se také často objevuje TBC (*Mycobacterium tuberculosis*), mozková toxoplazmóza (*Toxoplasma gondii*) a kryptosporidióza (*Cryptosporidium parvum*). Tato skutečnost odráží fakt, že je tato populace promořena původci těchto onemocnění. K oportunním infekcím se objevují i nádorová onemocnění, například charakteristický Kaposiho sarkom. Vzhledem k vyčerpání imunologické kompetence organismu je pro všechny kondice související s AIDS typická jejich recidivita. (4) (29)

2 DIAGNOSTIKA HIV

K diagnostice HIV se využívá výhradně virologická a serologická detekce protilátek a viru. Po infikování virem HIV se začnou brzy vytvářet imunologické a virologické markery v chronologickém pořadí: HIV RNA, HIV p24 antigen a protilátky anti-HIV. Virémie je detekovatelná v plazmě nejdříve za 2 týdny po nakažení (nejčastěji během 10-12 dnů). Titry viru se zvyšují exponenciálně, až k 1 miliónu kopií RNA na jeden mililitr během pár měsíců. (4) (30)

Antigen p24 může být detekovatelný v krvi o trochu později než virální RNA (přibližně 11-13 dní po infekci). V krvi je detekovatelný až do doby, kdy se proti němu vytvoří velká protilátková odpověď. Znovu lze prokázat až v pozdním a terminálním stádiu infekce. (4) (30)

Interval před vytvoření HIV specifických protilátek se nazývá „diagnostické okno“. Během této doby nelze detekovat HIV specifické protilátky, virémie (pomocí HIV RNA nebo antigenu p24) ani změny v množství CD4 T-lymfocytů. Objev specifických anti-HIV protilátek signalizuje konec diagnostického okna a infikovaného lze označit jako séropozitivního. (30)

HIV infekce může být odhalena měřením přítomnosti specifických anti-HIV protilátek. Jelikož jsou anti-HIV specifické protilátky nalezeny u všech HIV pozitivních lidí, jejich přítomnost se rovná diagnóze chronicky aktivní HIV infekce. Přímá diagnostika HIV infekce je také možná prokázáním antigenu p24 nebo virové nukleové kyseliny. Do kvalitativních metod řadíme stanovení virové nálože. (30)

Laboratorní vyšetření na přítomnost HIV lze rozdělit do tří kategorií: základní, konfirmační a speciální. Základní kategorie zahrnuje povinné screeningové vyšetření těhotných žen a dárců krve, plazmy, buněk, orgánů, tkání a mateřského mléka. Poté sem patří vyšetření diagnostická, indikovaná lékařem. Tato dvě vyšetření jsou u pojištěných jedinců hrazená zdravotní pojišťovnou. Dále do základní kategorie patří vyšetření na vlastní žádost (hradí ho žadatel) a v rámci prevence zejména u jedinců s vyšším rizikem výskytu HIV infekce (hradí ho zadavatel). Konfirmační vyšetření se dělají v České republice pouze v NRL pro HIV/AIDS v Praze. Dle zákona 258/200 Sb. jsou všechny vyšetřující subjekty povinné odeslat vzorek u kterého byl zjištěn reaktivní výsledek na konfirmaci do NRL. Pouze reaktivní výsledek z NRL lze označit jako pozitivní. Do kategorie speciálních vyšetření patří

stanovení koncentrace virové RNA v plazmě (virová nálož) a jsou důležité pro monitorování průběhu nemoci a účinku antiretrovirální léčby. Zařazujeme sem i genotypizační stanovení rezistence k antivirotikům, zjištění tropismu HIV pro indikaci určitého léčebného postupu anebo stanovení genotypu viru HIV-1 skupiny M. (4) (16) (30)

Většina základních testů využívá principu enzymové imunoanalýzy (enzyme immuno assay; EIA). Tyto testy musí být extrémně citlivé a minimalizovat tak výskyt falešně pozitivních výsledků. Musí být schopné detekovat i nízké titry a protilátky s nízkou aviditou (vyzrálostí protilátek), které se vyskytují na počátku infekce. (30)

Nutnost konfirmačních vyšetření podtrhuje fakt, že pouze 15% reaktivních vzorků zaslaných do NRL jsou doopravdy pozitivní. K potvrzení infekce se využívá nejčastěji Western Blot, případně imunofluorescence. Konfirmační metody musí být vysoce specifické a minimalizovat tím možnost výskytu falešných pozitivit. (4) (30)

2.1 Enzymoimunoanalýza, EIA

První generace enzymoimunoanalytických (EIA) analyzátorů byla vyvinuta v roce 1985. EIA metody dokáží pomocí imunochemické reakce s enzymatickou detekcí stanovit v neznámém vzorku koncentraci antigenu nebo protilátky (obecně analytu). Indikátorem imunoanalytické metody je enzymový konjugát. Podle vlastností substrátu je možno reakci detekovat spektrofotometricky, luminometricky, nefelometricky a fluorometricky. (30) (31)

EIA lze rozdělit na heterogenní a homogenní metody. Heterogenní vyžadují separaci volné i navázané frakce analytu, zatímco homogenní tuto separaci nevyžadují. Heterogenní mohou být kompetitivní (se značenou protilátkou nebo antigenem) nebo nekompetitivní (se značenou protilátkou). Nejčastěji používanou metodou EIA je ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Jde o speciální druh heterogenní enzymoimunoanalýzy a je buď nekompetitivní (sendvičová) nebo kompetitivní. V současné době je většina metod založena na principu heterogenní kompetitivní EIA se značenou protilátkou. (31)

Principem metody je navázání protilátky na pevnou fázi a po kompetitivní reakci s antigenem se v neznámém vzorku ustanoví rovnováha. Nenavázaný konjugát je následně odstraněn z reakční směsi promytím a konjugát navázaný na pevné fázi je inkubován s enzymovým substrátem a změřen. (31)

V praxi se jako pevná fáze využívá polystyrenová mikrotitrační destička o 96 jamkách, na jejichž stěny je navázána protilátka vyšetřovaného antigenu. Protilátka se může

navázat pouhou absorpcí, ale většina protilátek je navázána chemicky prostřednictvím např. kovalentních vazeb. Volná místa na destičce se blokují inertní bílkovinou (např. albuminem). Do jamky se přidá naředěný vzorek s antigenem a inkubuje se. Nenavázané složky se promyjí a přidá se druhá protilátka s navázaným konjugátem. Opět se vzorek nechá inkubovat a promyje se. Po přidání substrátu, který je štěpen enzymem navázaným na druhou protilátku, dochází k barevné reakci, která se měří fotometricky. (31)

V dnešní době se využívá čtvrtá generace EIA. Tyto metody jsou schopné detekovat jak protilátky, tak antigen p24, čímž se povedlo zkrátit diagnostické okno. Stále je zde ale riziko tzv. sekundárního diagnostického okna, které je sice vzácné, ale není vyloučené. Vzniká jako následek zpožděné protilátkové reakce. Pokud se množství p24 antigenů začne snižovat před vývojem specifických anti-HIV protilátek, může se stát, že vzorek nabraný brzy po infikování bude pozitivní. Nicméně vzorek od stejného jedince může být o pár týdnů později negativní, protože se množství antigenu p24 sníží pod detekční linii a anti-HIV protilátky zatím nejsou vyprodukovány. (30)

Současné EIA metody jsou citlivé na více než 99,9%, takže jsou detekované i velice nízké titry a protilátky s nízkou aviditou. Díky tomu jsou EIA v první linii pro detekci HIV pozitivních vzorků. Vysoce citlivé testy mohou mít nižší specifitu, konkrétně třetí a čtvrté generace EIA mají průměrnou specifitu mezi 99,5% až 99,9%, což může mít za následek občasnou falešnou pozitivitu. Falešně pozitivní výsledky se mohou objevit u pacientů s aktivovaným imunitním systémem, s akutní virovou infekcí, u očkovaných proti různým infekčním onemocněním (chřipka, žloutenka), u pacientů s autoimunitním onemocněním, ale i u těhotných a onkologických pacientů s maligní neoplazií či lymfomy. Z důvodu možné nespecifické reaktivity je důležité vzorek znovu otestovat a odeslat na konfirmační vyšetření. (30)

2.2 Western blot, WB

Western blot (WB) metoda se využívá nejčastěji jako konfirmační vyšetření. Umožňuje identifikovat specifické proteiny z komplexní směsi proteinů. Mnoho komerčně dostupných souprav obsahuje antigeny HIV-1 i HIV-2. HIV-1 proteiny detekovatelné pomocí WB jsou vyznačeny v tabulce č.4. Jednotlivá čísla proteinů odpovídají molekulární hmotnosti v kilodantonech (kDa). WB využívá kombinaci elektroforézy, vizualizační metody (nepřímá ELISA) a mezistupně, který se v angličtině označuje jako blotting (v češtině otisk). (30) (31) (32)

V běžné laboratoři se využívá materiál připravený výrobcem. Výrobci gelovou elektroforézou separují proteiny podle jejich molekulové hmotnosti. Proteiny se vlivem elektroforézy denaturují a získávají záporný náboj, díky čemuž cestují od záporného pólu ke kladnému. Malé proteiny cestují rychleji než ty s velkou molekulovou hmotností. Následně se separované proteiny přenesou elektroforeticky pomocí jednosměrného proudu z polyakrylamidového gelu na nitrocelulózový strip. (30) (31) (33)

Na strip se poté nanáší patientské sérum a inkubuje se. Jestliže sérum obsahuje protilátky proti virálním proteinům, naváží se na odpovídající místa na stripu. Zbytek séra se odsaje a strip se promyje. Přidá se konjugát s protilátkami proti IgG, které reagují s Fc fragmenty zachycenými na protilátkách pacienta (primární protilátky). Po dalším promytí se reakce na stripu zviditelní přidáním sekundárních protilátek navázaných na enzymy produkující barvu, které se naváží na primární protilátky. V případě přítomnosti protilátek vzniknou na stripu různě široké modro-fialové proužky na místech označených výrobcem. (30) (34) (33)

NRL pro HIV/AIDS využívá při interpretaci výsledků kritéria dle WHO. Jako pozitivní výsledek se označuje ten, který má na stripu viditelné alespoň dva env glykoproteiny a jeden gag nebo pol. Jako neurčitý výsledek se vyhodnocuje, když je patrný jeden env glykoprotein a gag nebo pol protein, případně jeden gag a jeden pol protein nebo jen jeden gag/pol proužek. (32)

Tabulka 4: Proteiny na Western blot stripu

Označení	Genom	Charakter	Vzhled na Western blotu
gp160	ENV	prekurzor gp110/120 a gp41	proužek s difusními okraji
gp110/120	ENV	obalový glykoprotein	proužek s difusními okraji
p68/66	POL	reverzní transkriptáza	jasný proužek
p55	GAG	prekurzor korového proteinu	dubleta
p52/51	POL	reverzní transkriptáza	jasný proužek
gp41	ENV	transmembránový glykoprotein	difuzní proužek
p40	GAG	prekurzor korového proteinu	jasný proužek
p34/31	POL	endonukleáza	jasný proužek
p24/25	GAG	korový protein	jasný proužek
p18/17	GAG	korový protein	někdy dubleta

Zdroj: (32)

WB metoda je vysoce specifická, ale také velice nákladná. Obtíže přináší i neurčité výsledky, které oddalují pevnou diagnózu a navyšují cenu vyšetření. V takovém případě by

se měl do 3-4 týdnů opakovat odběr. Následující vyšetření může definitivně prokázat sérokonverzi nebo lze opět dojít k neurčitým výsledkům. V takovém případě je většina pacientů HIV negativní a mají nespecifické protilátky. Jestliže je pacient v riziku nakažení nebo se obává, že je pozitivní, doporučuje se provedení PCR vyšetření ke confirmaci, že je pacient doopravdy HIV negativní. Z důvodu poměrně četných výskytů neurčitých výsledků WB není vhodnou metodou pro screening HIV. (30) (34)

2.3 Polymerázová řetězová reakce, PCR

Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction, PCR) se prokázala jako rychlá a efektivní kvalitativní metoda pro brzkou detekci HIV u všech pacientů. Lze využít k detekci integrované HIV provirální DNA získané z mononukleárních buněk periferní krve či plné krve, nebo k detekci HIV RNA v plazmě či séru, jakmile je RNA přepsána na DNA reverzní transkriptázou (RT). Princip spočívá v enzymatické amplifikaci DNA *in vitro* syntézou mnoha kopií vybrané DNA sekvence v cyklické reakce o třech teplotních fázích. (31) (35)

Vzhledem k tomu, že je HIV RNA virus, využívá se reverzně transkriptázová PCR (RT-PCR). Nejprve se HIV mRNA přepíše na cDNA pomocí reverzní transkriptázy (např. z viru ptačí myeloblastózy). Po skončení syntézy prvního vlákna cDNA je reverzní transkriptáza inaktivována a úseky DNA, které chceme analyzovat, jsou dále namnoženy pomocí klasické PCR. (31) (36)

Syntéza vláken je katalyzována termostabilní DNA polymerázou. Nejčastěji používaná polymeráza je izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus* (Taq) žijící v horkých pramenech. Amplifikovaný úsek je z obou stran ohraničen primery (oligonukleotidy), které přisedají ke koncům vybraného úseku díky své komplementaritě. Od primerů dochází za účinku Taq k syntéze DNA. Opakování teplotních cyklů, při kterých dochází k denaturaci, přisedání primerů a syntéze, vede k rychlému namnožení cílové sekvence DNA. Po každém cyklu dochází k zdvojnásobení počtu kopií úseku mezi následnými primery. (31) (37)

Specifita a citlivost PCR metody je více jak 90% a může dosáhnout až 100% když jsou procedury a podmínky testování pečlivě monitorovány a kontrolovány. Dokáže detekovat i malé množství virových částic. Je velice užitečný v diagnostice HIV novorozenců od infikovaných matek. Novorozenec má v sobě protilátky od matky přibližně do 15. měsíce života, tudíž pro ně protilátkový test není vhodnou indikací. (34) (35)

2.4 Průtoková cytometrie, FC

V roce 1954 Wallace Coulter vyvinul přístroj, který mohl měřit velikost a celkový počet buněk, a tak vznikl předchůdce průtokové cytometrie. Další vývoj umožnil detekci velikosti buněk a obsah nukleových kyselin za pomoci dvou-dimenzionálního postupu, který porovnával rozptyl a absorpci světla. Imunologové díky tomu začali zkoumat funkce různých buněk imunity. HIV pandemie ovlivnila pohled na průtokovou cytometrii tím, že se metoda začala místo výzkumu využívat primárně k diagnostickému testování na klinických zařízeních. V polovině osmdesátých let se cytometry díky postupu technologie a progresivnímu zmenšování celkového stroje staly dostupnějšími. Společně s dostupnějšími monoklonálními protilátkami (mAb), zvyšujícím se číslem dostupných fluorescenčních sond (molekuly, které emitují světlo o delší vlnové délce, než zdroj světla, kterým jsou excitovány) a zlepšení počítačů se cytometry staly přístupnými pro skoro všechny klinické laboratoře. (38)

Průtoková cytometrie (flow cytometry, FC) je standardní metodou pro analýzu buněk v suspenzi. Buňky se nejdříve označí pomocí mAb s navázanými fluorochromy. Molekuly mAb se specificky vážou na antigeny na povrchu či uvnitř vyšetřovaných buněk. Buněčná suspenze je v průtokovém cytometru hydrodynamickou fokusací vhnána do průtokové komory, kde buňky pomocí tlaku prochází po jednom. Proud buněk protíná laserový paprsek, který se od každé buňky rozptýlí do strany a zaznamenávají se dva parametry – Side scatter (SSc, rozptyl pod úhlem 90°) a Forward scatter (FSc, rozptyl v přímém směru). Tyto dva parametry určují velikost a granularitu buněk. Buňky s navázaným fluorochromem po nasvícení laserem začnou emitovat světlo, které je detekovatelné fluorescenčními kanály. Průtokové cytometry zvládnou najednou analyzovat minimálně čtyři fluorochromy zároveň se SSc a FSc. (31) (38)

Průtokový cytometr se skládá z několika základních částí, a to z excitačního zdroje, měřících optických cel, optických filtrů, systému zrcadel, fotodetektorů a několika fluorescenčních detektorů seřazených podle rostoucí vlnové délky emitované fluorescence. Mimo jiné obsahuje fluidický systém, který za pomoci hydrodynamické fokusace umožňuje buňkám jednotlivě procházet kapilárou. Zdrojem záření je nejčastěji argonový laser chlazený vzduchem, který emituje modré záření o vlnové délce 488 nm. Multiparametrické cytometry využívají minimálně dva lasery – modrý o délce 488 nm a červený o délce 635 nm. Novější generace cytometrů disponuje zdrojem dalších laserů, např. fialovým o vlnové délce 407 nm, nebo UV laserem o délce 350 nm. Rozptýlení tohoto světla při kontaktu s buňkou zachycují fotodetektory. Fluorescence emitovaná jednotlivými fluorochromy je detekovaná pomocí

fluorescenčních kanálů, které umožňují volbu vlnové délky analyzovaného signálu díky soustavě optických filtrů a zrcadel. Optické signály jsou v detektorech převedeny na elektrické impulzy, které se dále digitálně zpracovávají. (39) (40) (41)

Naměřená data se počítačově vyhodnotí a mimo numerické výsledky vypracuje i grafické znázornění ve formě histogramu, který přesně reflektuje vlastnosti celé buněčné populace v suspenzi. Signál naměřený detektorem FSc se vynáší na osu x a data z detektoru SSc na osu y. Dvoupříměrový histogram může být bodový, hustotní nebo vrstevnicový. Jestliže je populace detekovaných buněk dostatečně heterogenní, je možné v histogramu rozpoznat jejich jednotlivé typy. V případě kvalitního rozlišení náleží v histogramu jedné populaci jeden gate. (39)

Počet CD4⁺ T-lymfocytů je nejdůležitějším laboratorním parametrem pro určení stupně probíhající imunosuprese. Díky známému počtu CD4⁺ lze odhadnout risk výskytu oportunních infekcí, případně i smrti. Dále je velice důležitým parametrem pro výběr terapie a pro monitoraci efektivity užití terapie. Pro detekci CD4⁺ se využívají monoklonální protilátky proti znaku CD4⁺. Základ pro identifikaci a určení počtu CD4⁺ T-lymfocytů spočívá v specifickém užití elektronického gatingu lymfocytů v kombinaci CD45/CD4. (38) (42) (43) (44)

3 TERAPIE

Dosud nebyla vynalezena žádná specificky působící látka, která by eliminovala HIV z organismu. Za jeden z největších úspěchů v boji proti HIV lze považovat vysoká míra účinnosti moderní terapie. Dostupnost efektivní terapie přinesla dramatickou redukci morbidity a mortality v souvislosti s HIV infekcí. Z původně nevyhnutelně fatálního onemocnění se za účinku terapie stalo onemocnění chronické, kdy nemusí docházet k významnému zkrácení délky života infikované osoby. (4) (21) (42)

K terapii HIV infekce se nejvíce využívají antiretrovirotika. Jedná se o synteticky připravené látky zastavující proces množení viru. Její molekuly se rozdělují do několika skupin dle chemického složení a mechanického účinku. Část brání vstupu virové částice do cílové buňky, jiné brání činnosti virových enzymů (reverzní transkriptáze, proteáze a integráze). Zastavením množení viru se zastavuje i progres imunodeficientu. (4)

Za předpokladu správného účinku antiretrovirové léčby (ART) je útlum virového množení dlouhodobý a imunitní systém může začít reparovat vzniklou poruchu. Většina závažných onemocnění způsobených HIV infekcí je způsobena hlubokou imunodeficiencí. Obnova imunitního systému je tedy efektivním léčebným opatřením. V případě, kdy je ART zahájena v časně fázi onemocnění, je u některých osob po určité době funkčnost částečně obnovena. Protivirový efekt terapie trvá pouze po dobu jejího užívání, tudíž ji není vhodné přerušovat. Jedná se o doživotní léčbu. (4)

Většina léků je ve formě tablet, které se užívají denně po 12 až 24 hodinových intervalech. Je nutné dodržovat stanovené dávky a intervaly. Nezodpovědný přístup při užívání léků může způsobit nedostatečný léčebný efekt či přímo virovou rezistenci. (4)

První lék účinný proti HIV infekci byl uveden v roce 1987. Od té doby k němu přibývalo několik dalších desítek účinných preparátů. Léky se dělí do šesti skupin rozdělených podle mechanismu účinku. Do poloviny 90. let byly léčebné možnosti dost omezené. Léky se podávaly jednotlivě nebo se různě kombinovaly. Od 2. poloviny 90. let se využívá kombinovaná antiretrovirová terapie (cART – combination antiretroviral therapy), jejímž principem je kombinace tří či více léků alespoň ze dvou lékových skupin, nejčastěji dvou nukleosidových inhibitorů reverzní transkriptázy a jedním nenukleosidovým inhibitorem reverzní transkriptázy, integrázovým inhibitorem nebo inhibitorem proteázy. (4)

Studie mimo jiné zdůraznily, že má cART silný vliv na prevenci sekundárního přenosu HIV. U HIV pozitivních jedinců je nízká plazmatická HIV RNA spojena se sníženou koncentrací viru v genitálních sekretech. Risk přenosu HIV je nízký v případě, že je v plazmě virová nálož pod 400 kopií na mililitr krve. V komunitách s vysokým výskytem HIV pozitivních je užívání cART asociované se sníženou komunitní virální náloží a sníženým počtem nových HIV diagnóz. Další klinické studie silně podporují preventivní význam cART u diskordantních párů. U pacientů užívajících cART je risk přenosu na jejich neinfikovaného partnera zredukován o 96%. (45)

3.1 Nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy, NRTI

Nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (nukleoside reverse transcriptase inhibitors, NRTI) byly jako první léky proti HIV uvedeny v roce 1987. Jeho nejstarším zástupcem uvedeným do praxe byl zidovudine (AZT). Preparáty z této skupiny jsou doposud důležitou součástí léčby. Mechanismus jejich účinku je inhibice zpětného přepisu virové RNA do provirové DNA, která je začleňována do lidské DNA. (4) (45)

Obvykle je jako základ (backbone) užívaná kombinace dvou léků této skupiny. Komfortní užívání umožňuje tzv. fixní kombinace, kdy jsou 2 či více účinných látek v jedné tabletě. Příkladem mohou být kombinace dvou NRTI obsahující abacavir + lamivudin a emtricitabin + tenofovir. (4)

Hlavní nevýhodou NRTI je jejich vliv na fungování mitochondrií, který je označován jako mitochondriální toxicita, která stojí za většinou nežádoucích účinků jako je např. laktátová acidóza, hepatopatie či změna rozmístění tukové tkáně. (4)

3.2 Nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy, NNRTI

Nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NNRTI) se od NRTI liší svým chemickým složením i vazbou na reverzní transkriptázu. Problematickým zástupcem první generace je efavirenz, po kterém pacienti mohou trpět alergickou vyrážkou nebo různými neuropsychiatrickými příznaky jako poruchami spánku, nočními můrami nebo stavy podobnými opilosti. Mezi novější NNRTI patří etravirin a rilpivirin. Nevýhodou je, že se mezi jednotlivými zástupci NNRTI může vyskytovat zkřížená rezistence. (4)

3.3 Proteázové inhibitory, PI

Vývoj proteázových inhibitorů (protease inhibitors, PI) znamenal velký posun vpřed. PI inhibuje činnost HIV proteázy, která na konci replikačního cyklu štěpí dlouhý polypeptidový řetězec na malé částice a pomáhá tak s tvorbou nových virových částic. Inhibice proteázy tak zabraňuje dozrávání nových virových částic. Jenom kompletní a správně sestavená virová částice je schopná existence a dalšího napadání lidských buněk. (4)

Limitem PI je téměř kompletní metabolizace jaterním cytochromem P450. Tímto způsobem je metabolizována spousta léků určených k léčbě různých onemocnění. Některé mohou aktivitu jaterních cytochromů zrychlovat, některé zpomalovat. V případě lékových interakcí se může snížit hladina účinné látky pod terapeutickou hladinu, nebo naopak k jejich zvýšení s následným toxickým účinkem. Takové interakce lze využít k prospěchu podáváním ritonaviru, což je lék zpomalující metabolizaci jiných PI. Ritonavir svým tzv. boostujícím účinkem umožňuje podávání PI v nižších dávkách a delších intervalech. (4)

Mezi nejčastěji užívané zástupce patří lopinavir, atazanavir a darunavir. Všechny tyto druhy lze podávat výhradně s ritonavirem. Nevýhodou PI je četný výskyt nežádoucích účinků, nejčastěji v oblasti zažívání (žaludeční nevolnost, průjem, nechutenství). (4)

3.4 Inhibitory fúze, FI

Inhibitory fúze (fusion inhibitors, FI) mají enfuvirtid jako jediného zástupce. Svým působením zabraňuje napojení, fúzi a průniku virové částice do cílové buňky. Enfuvirtid se váže na gp41 a přerušuje membránové připojení. Je dostupný pouze v injekční podobě, což má každodenním užíváním za následek bolestivé rezistence v místech vpichu a u pacientů není příliš oblíbený. V současnosti se využívá spíše jen jako záložní terapie v případech, kdy došlo k selhání léků z ostatních skupin. (4) (46)

3.5 Inhibitory integrázy, INSTI

Inhibitory integrázy (integrase strand transfer inhibitors, INSTI) jsou jednou ze dvou nejnovějších lékových skupin. Klinicky využívané jsou od roku 2008. Léky této skupiny blokuje integraci provirové DNA do lidské DNA omezením fungování HIV integrázy. Mezi zástupce INSTI patří raltegravir, dolutegravir, elvitegravir a bictegravir. Jejich velkou výhodou je velice nízká míra vzniku nežádoucích účinků a velmi malý interakční potenciál. (4) (46)

3.6 Inhibitory vstupu, EI

Zatím nejnovější lékovou skupinou uvedenou do praxe jsou inhibitory vstupu (entry inhibitors, EI), označující se také jako inhibitory CCR5. EI blokuje CCR5 receptor na T-lymfocytech, čímž omezuje vazbu viru na koreceptor a brání tak připojení viru k buněčnému povrchu. Limitem léčby je existence dvou typů povrchových molekul – CCR5 a CXCR4. Většina virových kmenů je schopna vazby pouze na jeden z těchto koreceptorů, tudíž je nezbytné před zahájením léčby laboratorně prokázat tropismus k CCR5 molekule. Jestliže v těle převládají virové kmeny s afinitou k CXCR4, je léčba EI neúčinná. Zástupce je v současné době pouze maraviroc, který bývá pacienty obvykle dobře tolerován. (4) (46)

PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je sledování změn v zastoupení T-lymfocytů u HIV pacientů od prvního záchytu až po současnost a za účelem získání informací o změnách v průběhu terapie. K získání potřebných hodnot pro toto vyhodnocování využíváme metody fenotypizace základního lymfocytárního panelu na průtokovém cytometru. Při posuzování se zaměřujeme na základní T-lymfocytární subpopulace CD3+, CD4+, CD8+.

5 VÝZKUMNÉ OTÁZKY

Výzkumná otázka č. 1: Dochází ke změně zastoupení CD3+ v průběhu onemocnění HIV?

Výzkumná otázka č. 2: Dochází ke změně zastoupení CD4+ v průběhu onemocnění HIV?

Výzkumná otázka č. 3: Dochází ke změně zastoupení CD8+ v průběhu onemocnění HIV?

Výzkumná otázka č.4: Dochází ke změně indexu CD4/CD8 v průběhu onemocnění HIV?

6 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Pro praktickou část bakalářské práce bylo vybráno 10 pacientů z Plzeňského a Karlovarského kraje ve věku 38-56 let s diagnózou HIV. Jedná se o tři ženy a sedm mužů. V práci využívám data naměřená na průtokovém cytometru Navios Beckman Coulter (USA) zaznamenaná od roku 2006 až po 2021. Porovnáváme relativní počty CD3+, CD4+, CD8+ T-lymfocytů a v návaznosti na to imunoregulační index CD4/CD8.

7 METODIKA PRÁCE

Metoda fenotypizace krevních buněk je založena na schopnosti fluorochromem značených monoklonálních protilátek se specificky vázat k antigenním determinantám, které jsou exprimovány na povrchu leukocytů. Takto značené leukocyty jsou poté analyzovány pomocí průtokového cytometru. Monoklonální protilátky umožňují rozlišit následující T (CD3+) lymfocyty, pomocné (CD4+) a cytotoxické (CD8+) T-lymfocyty, zároveň je stanovena počítaná hodnota imunoregulační index (poměr CD4/CD8).

7.1 Preanalytická fáze

Vzorky žilní krve musí být odebrány do sterilních zkumavek obsahující antikoagulační činidlo EDTA nebo heparin. Vzorky nesmí být vystavovány teplotním šokům a účinkům přímého slunečního záření a silným vibracím. Vzorky by měly být transportovány při laboratorní teplotě a co nejdříve po odběru dodány do laboratoře. Před zpracováním jsou vzorky v laboratoři uchovávány při laboratorní teplotě ve tmě nejdéle po dobu 24 hodin po odběru. K měření by se neměly používat vzorky starší 24 hodin. Před zpracováním je nutné vzorek promíchat.

7.2 Analytická fáze

Přístroje

- Průtokový cytometr Navios Beckman Coulter
- Centrifuga
- Třepačka – vortex

Reagencie:

- Monoklonální protilátky TetraCHROME™ (Beckman Coulter)
- TBNK zkumavky se sušenými protilátkami (EXBIO)
- TBNK + HLA-DR zkumavky se sušenými protilátkami (EXBIO)
- Nosný roztok IsoFlow™ Sheath Fluid (Beckman Coulter)
- Lyzační roztok OptiLyse® (Beckman Coulter)
- Lyzační roztok EXCELLYSE Easy (EXBIO)

- Kontrolní vzorky IMMUNO-TROL Cells, IMMUNO-TROL Low Cells, Flow-Check Pro Fluorospheres (Becman Coulter)

Spotřební materiál:

- čisticí roztok Coulter Clenz Cleaning Agent
- Cytometrické zkumavky – falcon tube
- Zkumavky s filtrem
- Buničitá vata

Z lednice se vyndá krabička s kontrolami IMMUNO-TROL Low Cells = QCL, IMMUNO-TROL Cells = QCH, flow-check pro fluorospheres a směs protilátek Tetrachrom. Lahvička s IMMUNO-TROLEM se nechá vortexovat při cca 800 rpm cca 5 minut. Štítky s identifikací pacienta a s názvem skupiny metod K, KD nebo KDE se nalepí na pracovní list – průtoková cytometrie. Dle tohoto pracovního protokolu se připraví pracovní zkumavky, na které se nalepí čárové kódy:

- **Flow-check:** 5 ml zkumavka popsaná fixem – naplní se až před měřením (10-15 kapek)
- **IKK:** EXBIO zkumavka TBNK a čárový kód QCL nebo QCH
- **K:** 5 ml zkumavka a čárový kód K (uzavře se umělohmotnou zátkou)
- **KD:** EXBIO zkumavka TBNK a čárový kód D
- **KDE:** EXBIO zkumavka TBNK + HLA-DR a čárový kód E
- **BAL:** EXBIO zkumavka TBNK + HLA-DR a čárový kód BAL

Vzorek BALu se přefiltruje do zkumavky přes modrou zátku s filtrem. Do K zkumavek se na dno napipetuje 5 µl promíchané směsi protilátek TetraCHROME. Do QCL nebo QCH zkumavky se na dno napipetuje 50 µl promíchané kontroly IMMUNO-TROL. Do K, KD nebo KDE zkumavek se na dno napipetuje 50 µl promíchané plné krve. Zkumavky se zazátkují. Každá zkumavka se dá vortexovat při 16 000 rpm minimálně 20s. Zkumavky se vloží do držáku na vortexu a při 500 rpm se vortexují ve tmě po dobu 30 minut. Každá zkumavka se krátce vortexuje při 16 000 rpm. Dávkovačem se do zkumavek přidá:

- **K:** 400 µl lyzačního roztoku OptiLyse

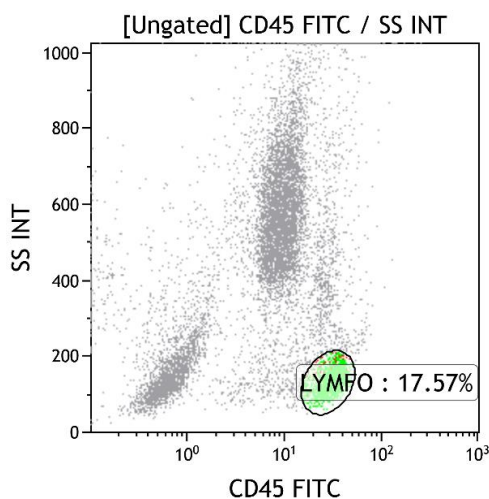
- **QCL, QCH, KD, KDE** – 1 ml lyzačního činidla EXCELLYSE Easy (1:9 naředěný koncentrát)

Zkumavky se zazátkují a opět se nechají vortexovat při 16 000 rpm. Ve vortexu se dále inkubují \pm 10 minut ve tmě. Poté se nechají krátce vortexovat při 16 000 rpm. Do zkumavek K se dávkovačem přidá 400 μ l IsoFlow a znovu se vortexují při 16 000 rpm. Následně se zkumavky K znovu inkubují ve vortexu \pm 10 minut ve tmě. Všechny zkumavky se nechají centrifugovat 3 minuty na 1800 ot/min a po zastavení centrifugy se ihned vytáhnou. Slije se supernatant a dávkovačem se přidá do každé zkumavky 400 μ l IsoFlow. Každá zkumavka se nechá krátce vortexovat při 16 000 rpm. Zkumavky K se nechají inkubovat ještě \pm 10 minut v lednici. Následuje samotné měření na průtokovém cytometru. Výsledky měření se automaticky přenáší do laboratorního informačního systému, kde jsou vyhodnocovány.

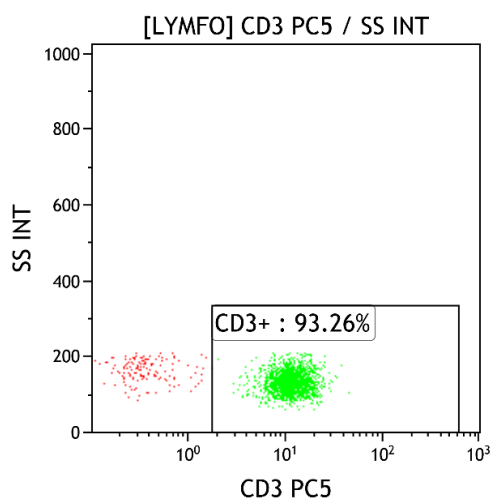
8 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Při analýze se využívají data všech provedených měření na průtokovém cytometru Navios (Beckman Coulter, USA) u sledovaných pacientů. Potřebná data k interpretaci výsledků byla vybrána pomocí gatovací strategie v softwaru CXP (Beckman Coulter, USA). Gatování umožňuje výběr konkrétních buněčných subpopulací na základě expresí povrchových markerů.

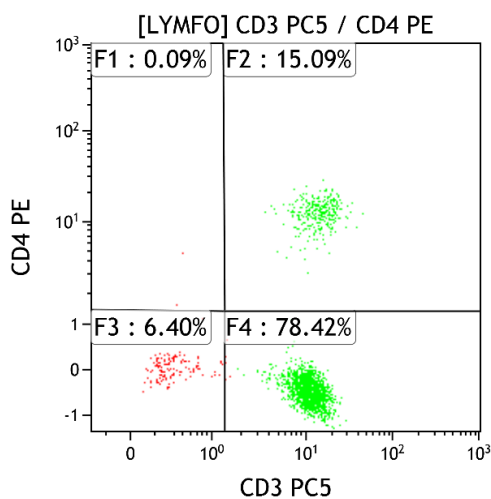
8.1 Gatovací strategie



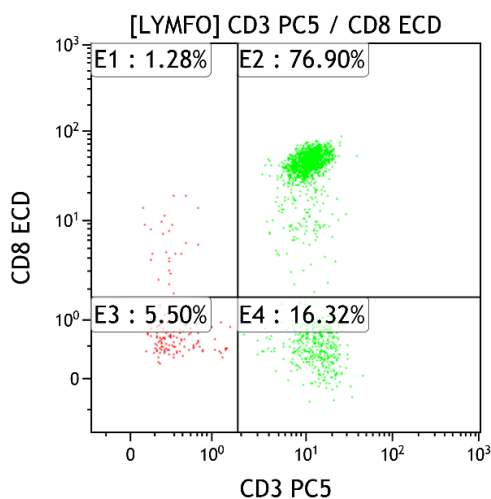
Obrázek 1: Analýza začíná v dotplotu CD45 proti SS (side scatter) vyhledáním lymfocytů, na obrázku označených zeleně (CD45+SS-). Z populace lymfocytů sestavujeme následující dot ploty. (Zdroj: vlastní)



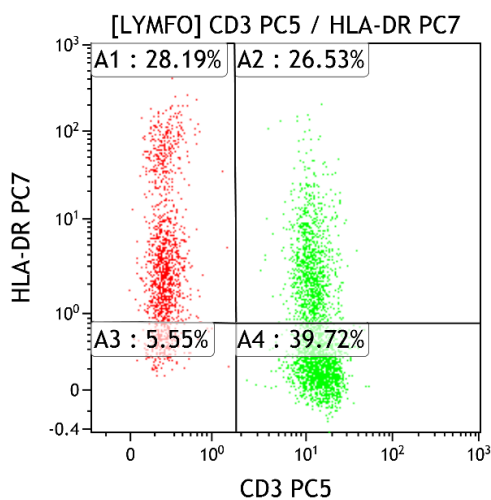
Obrázek 2: Dotplotem CD3 proti SS získáváme informaci o celkovém množství T-lymfocytů označených zeleně (CD3+SS-). (Zdroj: vlastní)



Obrázek 3: Dot plotem CD3 proti CD4 získáváme informaci o populaci pomocných lymfocytů (CD3+CD4+). (Zdroj: vlastní)



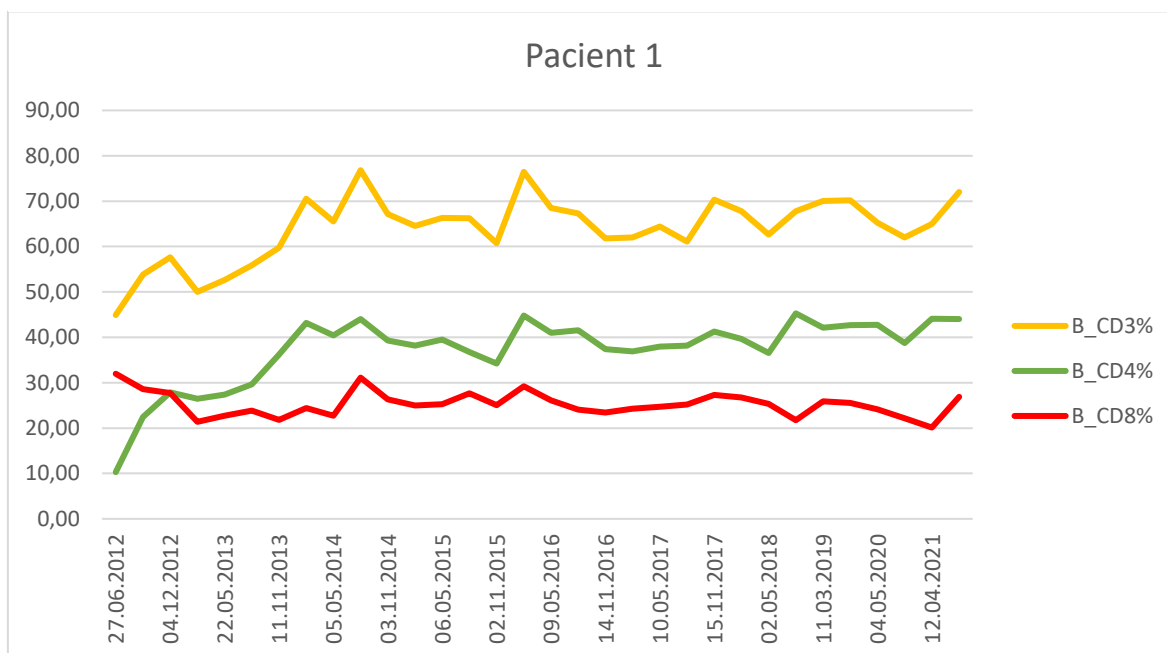
Obrázek 4: Dotplot CD3 proti CD8 vyobrazuje množství cytotoxických lymfocytů (CD3+CD8+). (Zdroj: vlastní)



Obrázek 5: Poslední dotplot CD3 proti HLA-DR nám dává informaci o aktivovaných T-lymfocytech (CD3+HLA-DR+). (Zdroj: vlastní)

8.2 Interpretace výsledků

Graf 1: Monitorace pacienta č.1



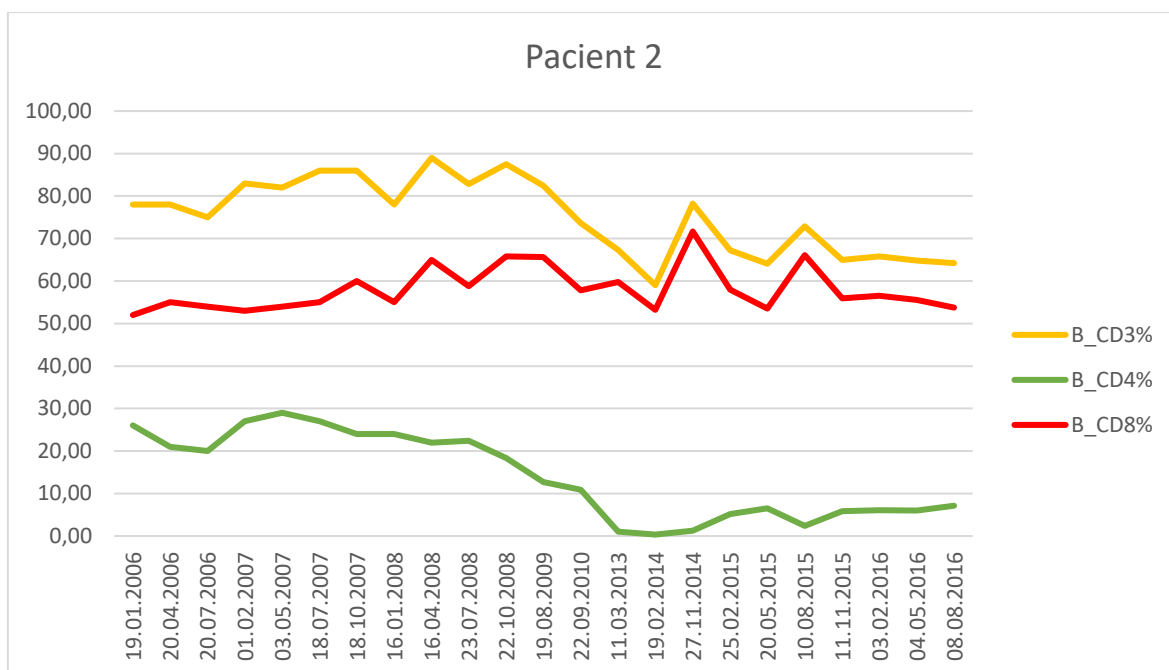
Zdroj: vlastní

U pacienta č.1 došlo k prvnímu záchytu v červnu 2012, při němž měl velmi snížený imunoregulační index CD4/CD8 o hodnotě 0,32. Další vyšetření se index dostal do normy s hodnotou 0,79.

CD4 po třech měsících narostly z původních 10,29% na 22,45% a dále exponenciálně rostly až do února 2014. Do referenčního rozmezí se CD4 dostaly již v listopadu 2013 a drží se v něm až doposud. CD3 se dostaly do referenčního rozmezí posléze v únoru 2014.

Zhruba tři měsíce od počátku léčby poměr mezi CD4 a CD8 přerostl dolní referenční hranici s číslem 0,78. Od té doby index rostl a z první naměřené hodnoty 0,3 se na posledním zaznamenaném vyšetření index rovnal 1,64.

Graf 2: Monitorace pacienta č.2

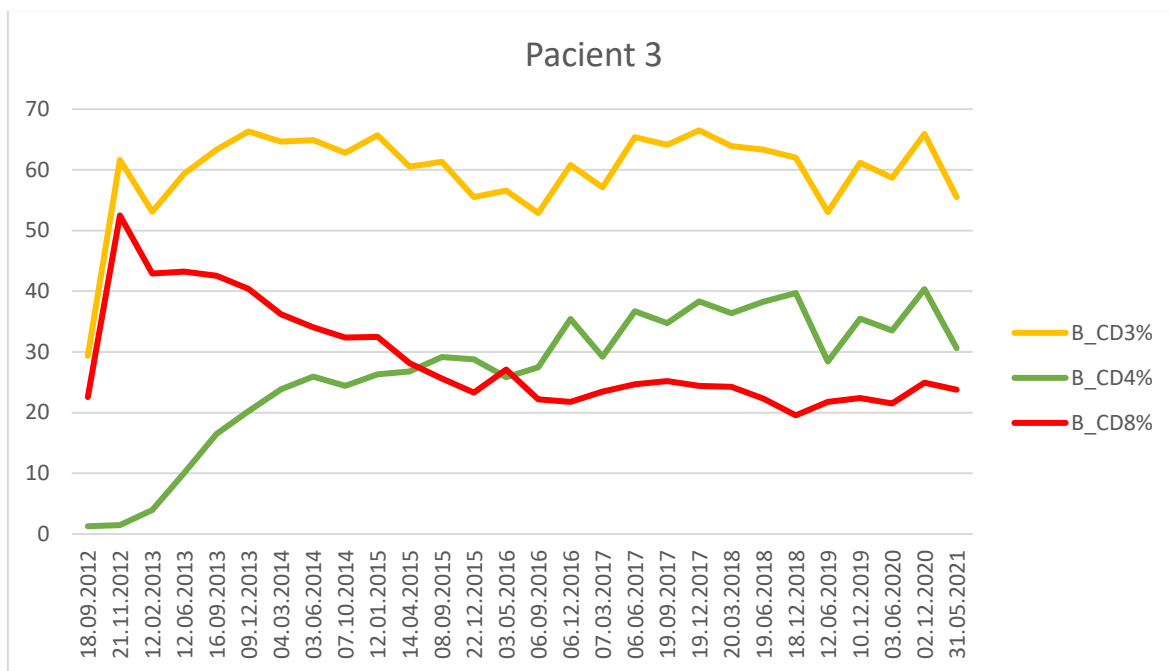


Zdroj: vlastní

Pacient č.2 je nonadherentní a léky užívá nepravidelně či vůbec. K dramatickému skoku došlo v roce 2013, kdy se pacient tři roky nedostavil na vyšetření. Pacientovy CD4 se dostaly na nulovou hodnotu v únoru 2014. Relativní počet CD4 činil 0,34%. Už původně nízký CD/CD8 index z prvního vyšetření o hodnotě 0,5 se během osmi let snížil na 0,006.

CD3 se po celou dobu drží v referenčních mezích s výjimkou období od července 2007 do října 2008, kdy byly převážně zvýšené. CD8 se konstantně drží ve vyšších hodnotách. Poslední zaznamenané vyšetření v srpnu 2016 byl u pacienta CD4/CD8 index 0,13.

Graf 3: Monitorace pacienta č.3



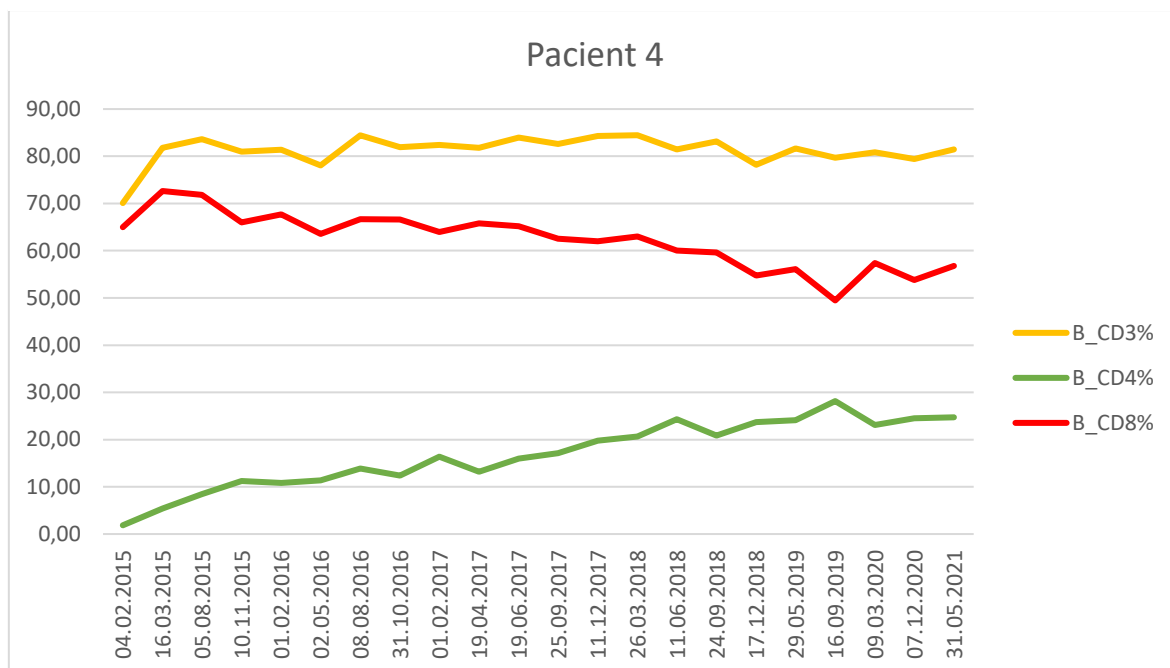
Zdroj: vlastní

Třetí pacient byl poprvé zachycen v září 2012 s výrazně sníženým počtem CD4, ale s nástupem terapie se jeho hodnoty dostaly téměř do normálu.

Z počátečního relativního počtu 1,28% se hodnoty CD4 dostaly do normálu ke konci roku 2016 se dále jen mírným kolísáním pod referenční hranici. Nejvyšší naměřený počet 40,34% se zaznamenal v roce 2020. O 5 měsíců později se hodnota zredukovala o čtvrtinu na 30,61% a byla tak pod referenční hranicí.

CD3 se po celou dobu drží průměrně v relativním počtu 60,93%, což je mírně pod referenční mezí. CD8 jsou po celou dobu monitorace v referenčním rozmezí. Imunoregulační index byl při prvním záchytu 0,06 a při posledním vyšetření 1,29.

Graf 4: Monitorace pacienta č.4

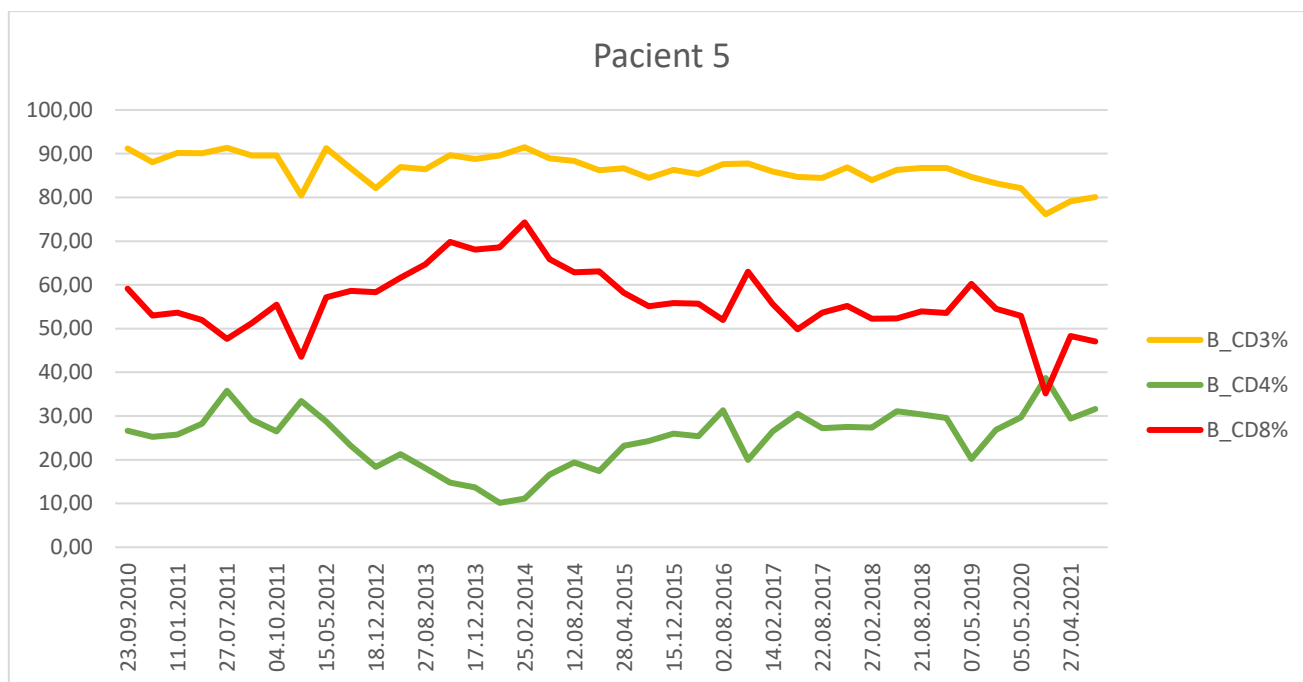


Zdroj: vlastní

Čtvrtý pacient je poprvé zaznamenán v únoru 2015 s velmi nízkým počtem CD4 1,85% a zároveň vysokým počtem CD8 64,98%. CD3 jsou již od prvního vyšetření po celou dobu v normě, průměrně se drží na 81,26%.

CD4 zůstávají po celou dobu léčby snižené, pravděpodobně kvůli počátečním extrémně nízkým hodnotám, ale jejich množství pomalu roste. CD8 jsou zvýšené, ale jejich počet v průběhu let klesá. Původní CD4/CD8 index 0,03 z roku 2015 se navýšil na 0,44 během šesti let. Index je tak nadále pod spodní hranicí referenční meze.

Graf 5: Monitorace pacienta č.5



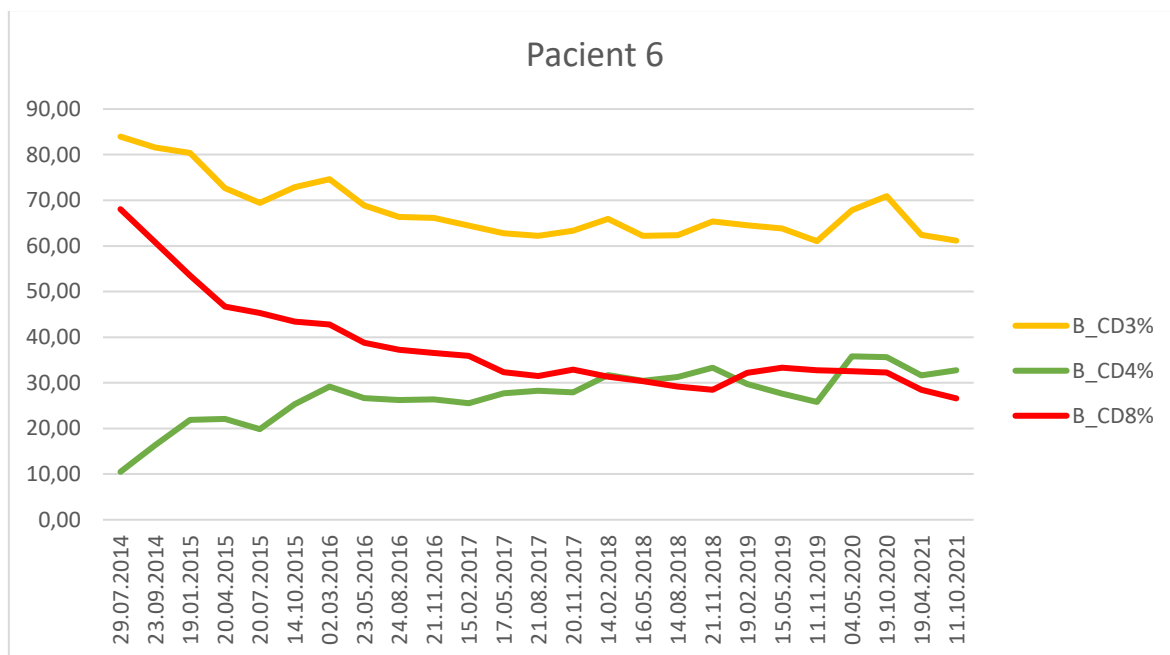
Zdroj: vlastní

Pacient č.5 je sledován od září 2010, kdy byly pacientovi stanoveny lehce snížené hodnoty CD4 a zvýšené hodnoty CD3 a CD8. Imunoregulační index se rovnal 0,45. Během roku 2011 až do začátku roku 2012 se zvyšoval, ale v srpnu došlo k úpadku souvisejícím se zhoršením chronického onemocnění. Úpadek přetrvával do roku 2014, kdy index činil 0,15. Od dubnu téhož roku začal index pomalu růst.

Po celou monitoraci byly CD3 zvýšené a do referenčního rozmezí se dostaly v listopadu 2019, kde i nadále setrvávají. Obdobně na tom byly i CD8, které se do normálních hodnot dostaly o rok později. CD4 od úpadku dosáhly referenčního rozmezí v roce 2018 a taktéž v něm přetrvávají.

Z dostupných dat došlo k peaku indexu CD4/CD8 v listopadu 2020, kdy se rovnal hodnotě 1,1. Všechny sledované subpopulace jsou od téhož vyšetření v referenčním rozmezí.

Graf 6: Monitorace pacienta č.6



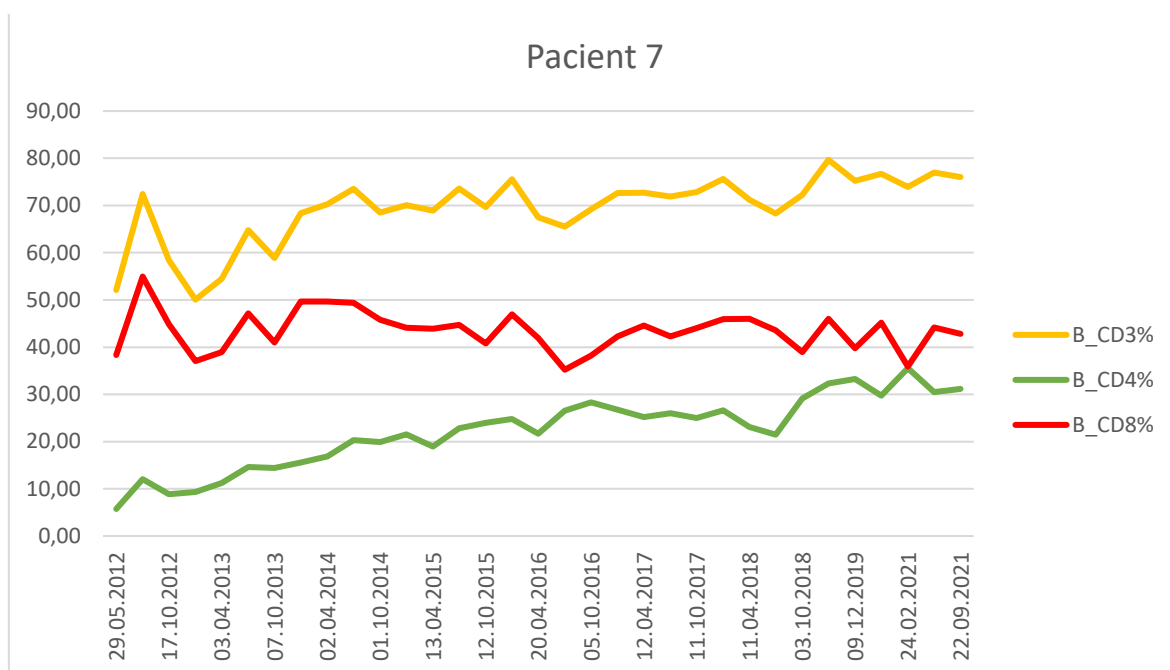
Zdroj: vlastní

Pacient č.6 byl poprvé podchycen v červenci 2014 s velkým imunodeficitem. Jeho imunoregulační index tehdy činil 0,15. Poslední zaznamenané vyšetření v říjnu 2021 se zlepšil na 1,2.

Po nástupu terapie začaly hodnoty CD4 stoupat a z původního relativního počtu 10,50% se v březnu 2016 dostaly na normální hodnotu 29,15%. Do listopadu 2017 CD4 kolísaly a držely se spíše pod referenční hranicí. To se změnilo v únoru 2018, od kterého hodnoty setrvávají v referenčním rozmezí.

CD8 přetrvávají v normě již od dubna 2015, tedy od necelého roku od zahájení léčby. CD3 jsou v normě již od prvního záchytu. Na základě viditelného zlepšení ve výsledcích pacienta lze terapii označit za účinnou.

Graf 7: Monitorace pacienta č.7



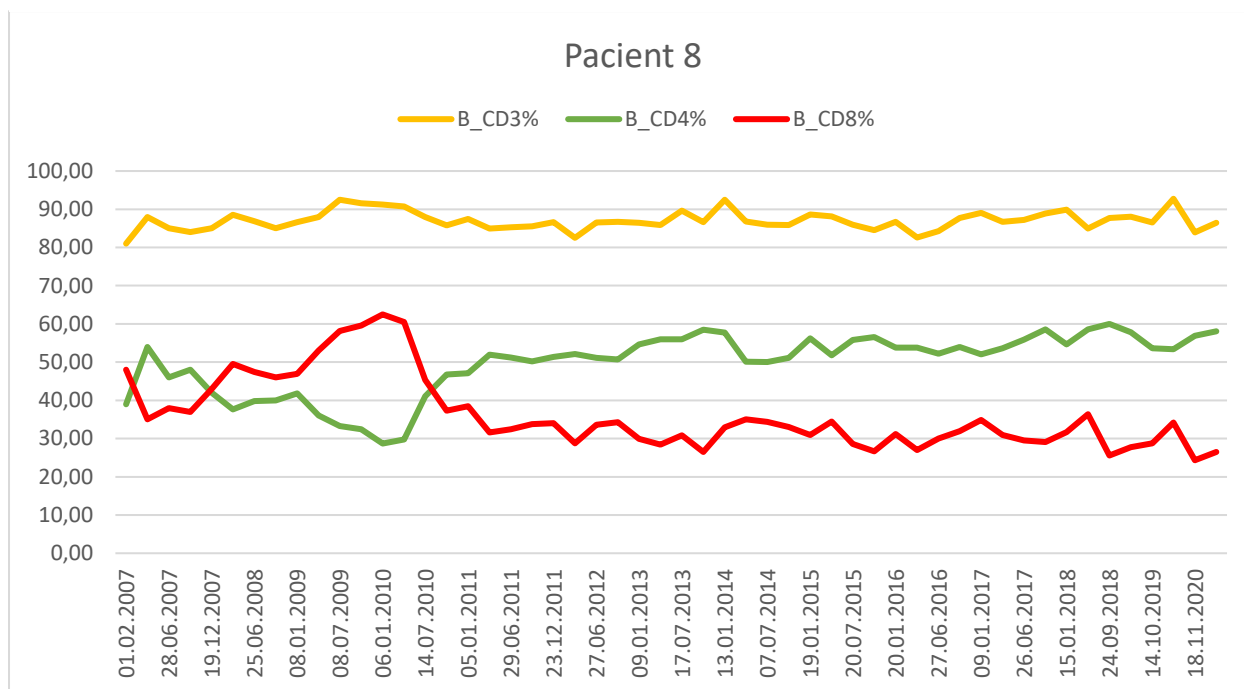
Zdroj: vlastní

Pacientovi č. 7 byly na prvním vyšetření v květnu 2012 stanoveny velice nízké hodnoty CD4 o počtu 5,73% a CD3 o počtu 52,10%.

Během dvou měsíců došlo k prudkému nárůstu CD3 do normy a k nárůstu CD8 nad normu. Zároveň se zvýšily i CD4 na 12,02%. Další měření v říjnu 2012 se CD3 a CD4 dostaly téměř na původní hodnoty. CD8 po zbytek vyšetření přetrvávají v normě, s výjimkou tří po sobě jdoucích vyšetření v roce 2014, kdy byly těsně nad hranicí.

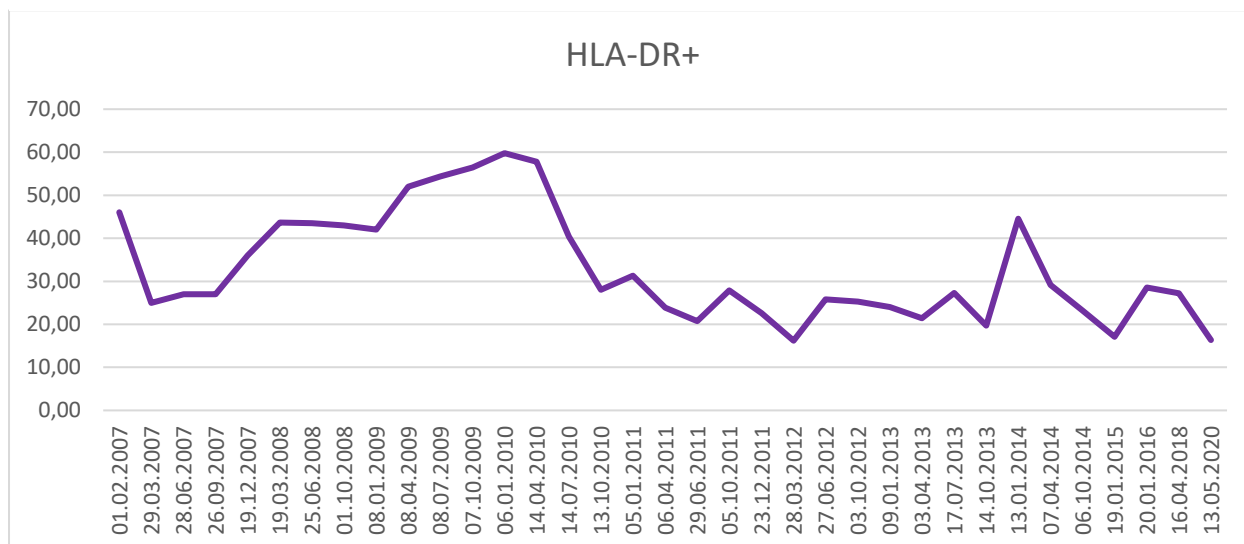
V normálu se CD3 ustálily s drobným kolísáním v lednu 2014. CD4 začaly pomalu růst od dubna 2013 a do referenčních hodnot se dostaly až v únoru 2021, ale jejich počet poslední dvě následující vyšetření opět klesl. Z původního imunoregulačního indexu 0,15 se do nejlepších výsledků pacient dostal právě v únoru 2021 s hodnotou 0,99.

Graf 8: Monitorace pacienta č.8



Zdroj: vlastní

Graf 9: Hodnoty HLA-DR+ u pacienta č.8



Zdroj: vlastní

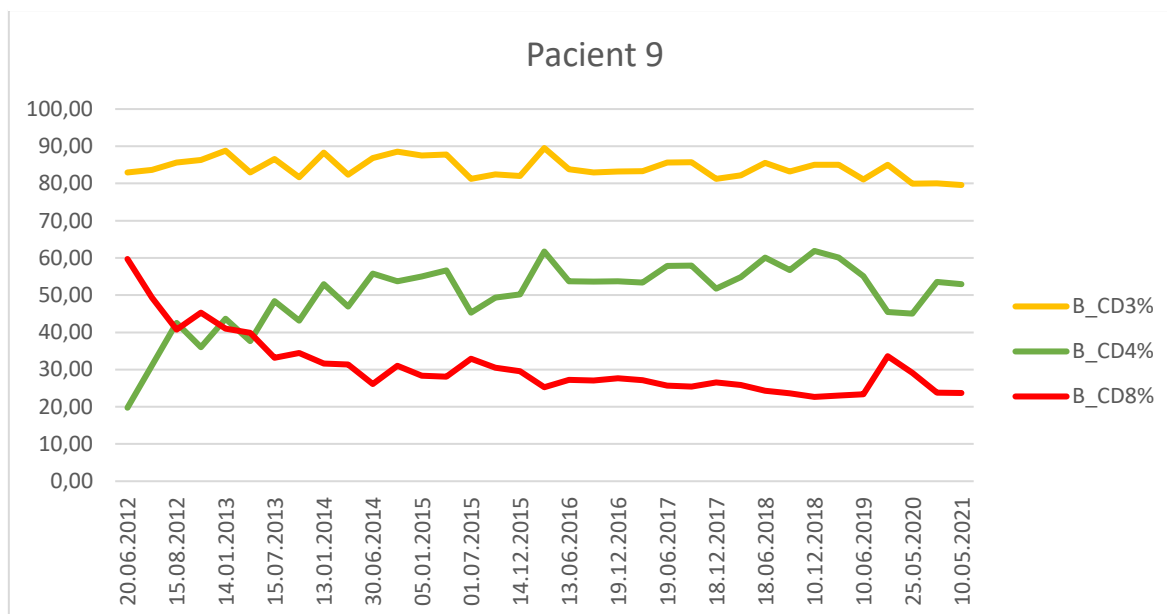
Pacient č.8 byl v únoru 2007 podchycen v asymptomatickém stavu ještě před rozvojem imunodeficitu. Díky dostatečnému množství testů buněk HLA-DR+ vhodných k interpretaci je přiložena samostatná tabulka s jejich hodnotami. Pacient měl první vyšetření vysoké množství HLA-DR+, a to až dvojnásobně od horní referenční meze, na 46%, což poukazuje na vysokou aktivitu viru.

Hodnoty HLA-DR+ se nástupem terapie snížily během roku 2007 na průměrně 26% a opět vyrostly během let 2008-2010. Společně s nimi vyrostly v letech 2009 a 2010 i CD8. K nárůstům obou markerů došlo z důvodu těžké exacerbace dermorespiračního syndromu a nástupu biologické léčby.

CD8 se v červenci 2010 opět dostaly do normálu, ve kterém se drží doposud. CD4 byly od počátku, až na jednu výjimku, v referenčních mezích. Až od roku 2013 začaly CD4 střídavě kolísat mezi horní referenční mezí a přebytkem. V referenční mezi jsou CD4 stabilně od roku 2019. CD3 jsou po celou dobu monitorování zvýšené. Pouze během pěti vyšetření během probíhajících komplikací se dostaly lehce pod horní referenční mezi.

Imunoregulační index změřený v únoru 2007 o hodnotě 0,81 se při posledním vyšetření v květnu 2021 vyšplhal na 2,19. Tato informace je pouze doplňková, protože dolní referenční hranice byla vzhledem k věku pacienta 0,60 a tu přesahoval již od počátku.

Graf 10: Monitorace pacienta č.9



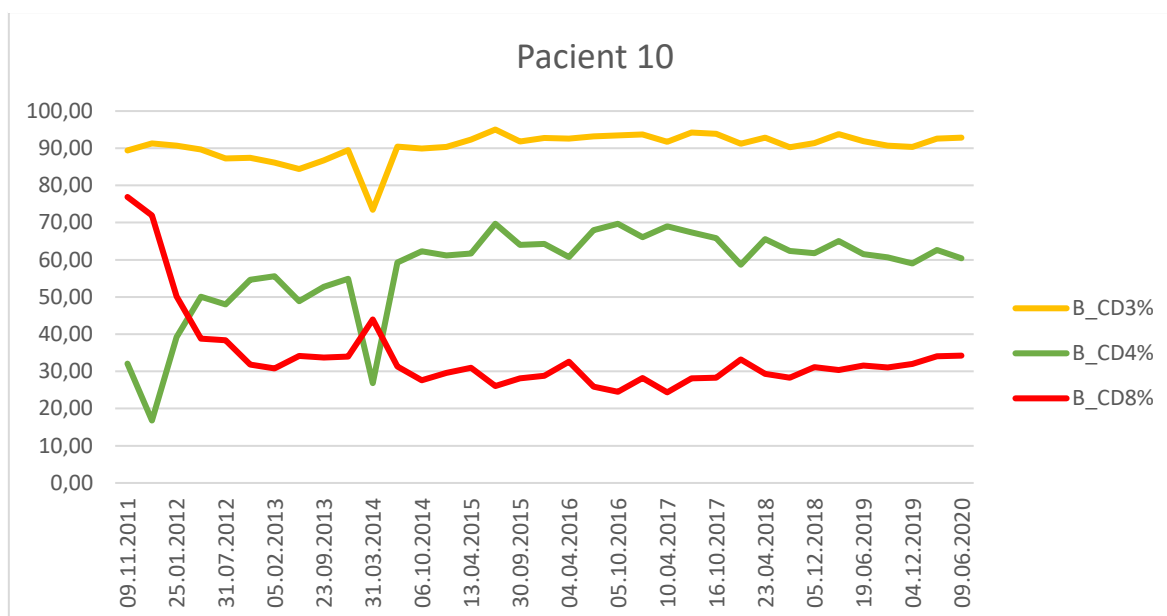
Zdroj: vlastní

V případě pacienta č. 9 došlo k záhytu pravděpodobně během probíhajících komplikací souvisejících s infekcí HIV. Na prvním vyšetření v červnu 2012 mu byly stanoveny relativní počty CD4 19,75%, CD8 59,71%, HLA-DR 42,26% a CD3 o počtu 82,98%, které jako jediné dosahovaly referenčního rozmezí. Imunoregulační index CD4/CD8 činil 0,3.

Vyšetření o měsíc později aktivita viru klesla na základě stanovení HLA-DR, které v tomto grafu není vyobrazené, z původních 42% na 24%. CD4 se dostaly do normálu a CD8 byly mírně přes horní referenční hranici. Při vyšetření v srpnu oba markery dosáhly referenčního rozmezí, ve kterém setrvávají až po současnost. Výkyvy jsou pozorovány pouze mezi lety 2018-2019, kdy CD4 přesáhly horní hranici.

Další kolísání přes horní referenční hranici je po téměř celou dobu monitorace znatelné u CD3. Poslední tři vyšetření se však hodnoty normalizovaly. Původně velmi nízký imunoregulační index se v květnu 2021 rovnal 2,23.

Graf 11: Monitorace pacienta č.10



Zdroj: vlastní

Poslední pacient byl poprvé zachycen na začátku listopadu 2011 s nízkým imunoregulačním indexem 0,4. CD4 sice dosahovaly normálních hodnot, ale CD3 a zejména CD8 byly zvýšené. Počátkem prosince 2011 CD4 klesly prudce o polovinu, pravděpodobně kvůli přítomnosti jiné infekce než HIV. CD3 a CD8 zůstaly zvýšené.

Od ledna 2012 dosáhly CD4 normy a nadále rostly. O tři měsíce později dosáhly normy i CD8, kde se drží do současnosti. CD4 jsou od roku 2014 až na výjimku dvou vyšetření konstantně zvýšené.

CD3 marker zůstává po celou dobu monitorace ve vysokých hodnotách. Z celkových 38 vyšetření byly CD3 v normě pouze dvakrát, a to v roce 2013 a 2014. V právě zmíněném vyšetření v roce 2014 došlo zároveň k prudkému poklesu CD4 pod normu z důvodu nepravidelného užívání léků. Další vyšetření byly CD4 opět zvýšené. Imunoregulační index při posledním vyšetření v červnu 2020 vyrostl na hodnotu 1,7.

DISKUZE

První výzkumná otázka dává za úkol zjistit, zda dochází u pacientů ke změnám zastoupení CD3+ v průběhu onemocnění HIV. Při prvním záchytu měli snížené množství CD3+ pacienti 1, 3 a 7. V referenčním rozmezí se nacházeli pacienti 2, 4, 6, 8 a 9. Zvýšené hodnoty vykazovali pacienti 5 a 10.

Během léčby se normalizovaly hodnoty CD3+ u pacientů 1 a 7 z původního sníženého množství. Pacient č. 3 měl více než polovinu vyšetření snížené hodnoty. Pacienti č. 2, 4 a 6 setrvali v referenčním rozmezí. K navýšení nad normu došlo u pacienta č. 8 a 9. U pacientů 5 a 10, kteří měli CD3+ navýšené, přetrvává ve zvýšených hodnotách pacient 10, zatímco pacient 5 se normalizoval během posledních pěti vyšetření.

Sedaghat a spol. ve své studii vyzorovali u pacientů s progresivním onemocněním depleci CD4+ buněk doprovázenou zvýšením počtu CD8+, díky čemuž počet CD3+ zůstává zhruba stejný. Tomuto fenoménu se říká slepá homeostáza. (47) (48)

Studie Margolicka a spol. popsala pokles CD3+ lymfocytů jako možný znak předvídající progresi HIV do AIDS. Imunitní systém je samozřejmě příliš komplexní na to, aby se tento děj vztahoval na všechny pacienty, u kterých ke snížení počtu CD3+ dojde. Snížení může také souviset například se věkem, na což se zaměřila německá studie a vyzorovala pokles CD3+ u pacientů nad 50 let. (49)

Cílem druhé výzkumné otázky bylo zjistit, zda u pacientů dochází ke změnám zastoupení CD4+ v průběhu onemocnění. U valné většiny sledovaných pacientů je viditelné, že nejvíce dynamickým markerem jsou CD4+ T-lymfocyty. Právě CD4+ znak je primárním laboratorním markerem ukazujícím přechod HIV do AIDS. Za přechod do AIDS se považují stavy, kdy relativní počet CD4+ klesne pod 14% včetně. Nízké množství CD4+ buněk tedy obecně u HIV pacientů indikuje narušenou imunitní funkci. (50)

Je dobré dodat, že ne všechny buňky exprimující znak CD4 podléhají rychlé depleci. Např. makrofágy produkují viry celé týdny a infikované makroglie přežívají dokonce měsíce, ne-li roky. Tato zjištění poukazují na to, že virová infekce a replikace nejsou neodmyslitelně spojeny s buněčnou smrtí. (51) (52) (53)

Studie Doitsche identifikovaly pyroptózu jako mechanismus způsobující dva typické jevy HIV infekce, a to právě depleci CD4+ T-lymfocytů a chronický zánět. Tato informace poskytla příležitost pro zacílení terapeutik na pyroptotickou dráhu. (51) (54)

Za smrt aktivovaných permisivních CD4+ buněk zodpovídá apoptóza zprostředkovaná kaspázou-3. Tyto buňky tvoří asi jen 5% z celkového počtu CD4+ buněk. Zbývajících více jak 95% klidových CD4+ buněk v lymfoidní tkáni umírá právě pyroptózou vyvolanou abortivní HIV infekcí zprostředkovanou kaspázou-1. Pyroptóza figuruje jako intenzivní zánětlivá forma programované buněčné smrti, při které se uvolňuje cytoplazmatický obsah a prozánětlivé cytokiny, včetně IL-1 β . Tento proces vede k patogennímu začarovanému kruhu, ve kterém umírající CD4+ buňky uvolňují zánětlivé signály, které přitahují více buněk (převážně centrální paměťové CD4+ buňky) do lymfatické uzliny, čím vzniká hromadný prozánětlivý sebevražedný cyklus. Tento cyklus lze prolomit inhibitory kaspázy-1, které jsou u lidí prokazatelně bezpečné. (51) (54)

U zdravých jedinců tvoří CD4+ lymfocyty přibližně 65% celkového počtu T lymfocytů, a tak je pokles CD4+ buněk odrazem snižujícího celkového počtu T-lymfocytů. Velmi snížené množství CD4+ a zároveň snížený celkový počet T-lymfocytů, CD3+, pozorujeme při prvním záchytu u pacientů 1, 3 a 7. (25) (55)

Studie Gua a spol. sledovala dynamiku T-lymfocytů během 8 let ART. Pacienti podchytení v chronické fázi onemocnění nedosáhli normálního rozmezí CD4+ ani po dlouhodobé léčbě. Studie popsala, že vlivem ART dochází k rekonstituci CD4+ buněk dvoufázově, kdy nejdříve dochází k rychlému nárůstu během prvních měsíců a poté následuje pozvolnější nárůst během následujících let. První fáze je charakterizována expanzí a redistribucí CD4+ paměťových buněk. V druhé fázi dochází k rekonstituci CD4+ naivních buněk a snížení imunitní aktivace T-lymfocytů. (56)

Studie Pakkera a spol. uváděla již v roce 1993, že počáteční rapidní nárůst CD4+ v prvních 3 týdnech užívání ART je pravděpodobně způsobený redistribucí buněk uvězněných v lymfoidní tkáni spíše, než jejich novotvorbou. Rapidní nárůst je patrný u pacientů 1, 8 a 9, v menším měřítku i u pacientů 3, 4, 6 a 7. U pacienta 10 můžeme sledovat rychlý nárůst za předpokladu, že léčbu začal užívat až měsíc od prvního testu. Růst nepozorujeme pouze u pacientů 2 a 5. (57)

Další otázkou je to, zda u pacientů dochází ke změnám zastoupení CD8+ lymfocytů v průběhu onemocnění. HIV tuto populaci buněk narušuje, způsobuje její dysfunkci a trvalé zvýšení. Ke zvýšení dochází důsledkem kompenzace ztrát CD4+ lymfocytů. Množství CD8+ je markerem imunitní aktivace a je důležitým faktorem pro progresi onemocnění. Chronická infekce je stav způsobený chronickou imunitní aktivací, která je důsledkem perzistentní virové replikace. (58) (59) (60)

Podle již zmiňované studie Pakkera a spol. se CD8+ lymfocyty obnovují nejrychleji v průběhu prvních 6 týdnů od počátku ART. HIV narušuje CD8+ populaci buněk, čímž dochází k jejímu trvalému zvýšení a její dysfunkci. (57) (58)

Zatímco progresi onemocnění je asociovaná s postupným úbytkem CD4+ buněk, počet CD8+ buněk je zvýšený po celou dobu infekce až do pozdní fáze, kdy dochází k depleci všech subtypů T-lymfocytů. Trvale zvýšené množství CD8+ během dlouhodobé ART se spojuje se zvýšeným rizikem klinických komplikací nesouvisejících s AIDS, zahrnující malignity a kardiovaskulární onemocnění, a to nezávisle na obnově CD4+ buněk. (58)

U pacientů č. 1, 3, 7 a 8 přetrvalo množství CD8+ v referenčních hodnotách od prvního záchytu po celou dobu monitorace s výjimkou ojedinělých případů převýšení během léčby. Další skupinu tvoří lidé, kteří měli hodnoty CD8+ v době prvního vyšetření vysoké. Jedná se o zbylé pacienty č. 2, 4, 5, 6, 9 a 10. Pacienti č. 2 a 4 mají po celou dobu monitorace trvale zvýšené CD8+. Pacient č. 5 měl hodnoty zvýšené po dobu 88% vyšetření. K normalizaci došlo během posledních tří vyšetření. U pacientů č. 6, 9 a 10 byly zvýšené hodnoty CD8+ pouze během prvních dvou až tří vyšetření, přičemž od té doby setrvávají v referenčních mezích.

Spousta studií prokázala zvýšení počtu CD8+ buněk u neléčené HIV infekce, některé uvádějí pokles počtu CD8+ po zahájení antiretrovirální léčby. Zvýšené počty CD8+ mělo celkem šest pacientů z deseti. Ke snížení po zahájení léčby došlo u tří pacientů ze zmíněných šesti. (61) (62)

Perzistence CD8+ buněk v krvi i tkáních je odrazem chronického zánětu a imunitní aktivace, kdy u těchto vyčerpaných buněk došlo k nevratným epigenetickým změnám. Kromě reziduální virové replikace přispívá k perzistenci CD8+ také perzistence virových proteinů, poškození střevní sliznice a také faktory jako je například cytomegalovirová

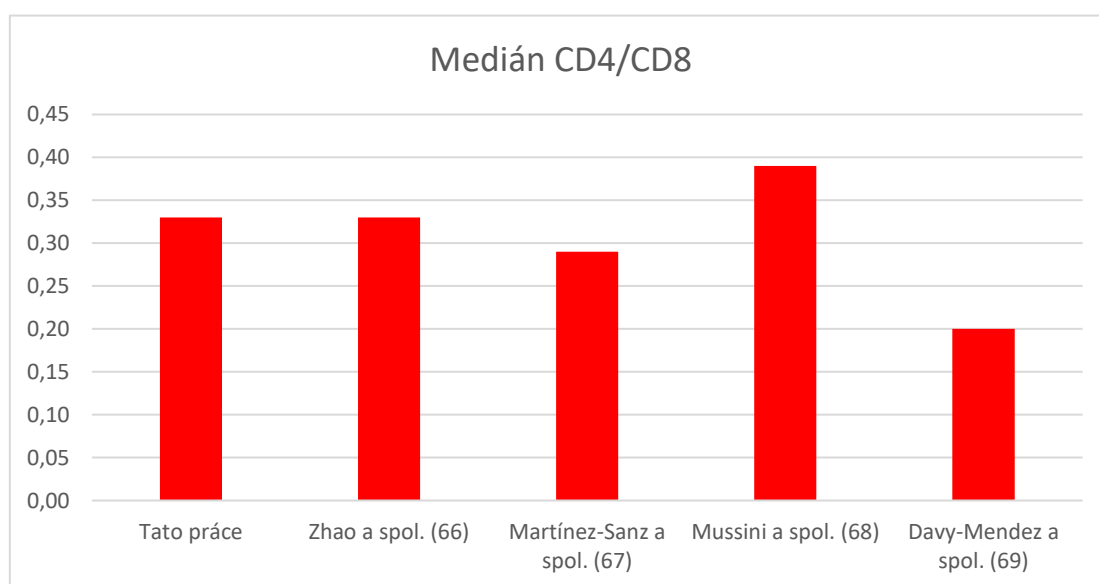
infekce. V tomto procesu hraje roli spousta složek imunitního systému, zejména bylo prokázáno, že hrajou kritickou roli sítě cytokinů a chemokinů. (58)

Studie Tanga a spol. nevyozorovala žádný významný rozdíl v proporci CD3+ T-lymfocytů u zdravých či HIV pozitivních jedinců, zatímco hodnoty CD4+ a CD4/CD8 byly u HIV pozitivních pacientů výrazně nižší, než u kontrolní, zdravé skupiny. Co se týče CD8+ T-lymfocytů, patientská skupina prokazuje vyšší hodnoty než skupina kontrolní. (25)

S CD4+ a CD8+ se pojí imunoregulační index CD4/CD8, který je u neléčených HIV pozitivních typicky invertní. Tento index lze interpretovat jako míru nerovnováhy imunitního systému, který mimo hladin počtu buněk obou subtypů zachycuje zásadní informace navíc. Trvale nízký CD4/CD8 index u pacientů dlouhodobě podstupujících léčbu implikuje tento marker zánětlivost, pokračující imunitní dysfunkci a vysoké riziko non-AIDS morbidity a mortality. U zdravé populace nízký CD4/CD8 index představuje narušení imunitní funkce, imunosenescenci a chronický zánět. (63) (64) (65)

Během prvního záhytu byl medián CD4/CD8 indexu rovný 0,33. Následující graf (č.12) ve sloupcích znázorňuje rozdíl mezi mediánem z této práce a mediány čtyř různých studií (Čína, Španělsko, Itálie, USA). Z grafu je zřejmá shoda mediánu této práce a Čínské studie, zatímco studie z USA měla oproti ostatním výrazně nižší medián.

Graf 12: Porovnání mediánu CD4/CD8 z této práce a čtyř různých studií.



Dle studie McBride a Strikera může být index CD4/CD8 významnějším markerem než samotný absolutní počet CD4+ buněk, protože přesněji popisuje celkovou imunitní dysfunkci a může být lepším ukazatelem progresu onemocnění, odpovědi na léčbu, nemocnosti a morbiditu u virologicky suprimovaných pacientů. Dále studie zmiňuje, že i přes úspěšnou ART a virovou supresi absolutní počet CD4+ a virová nálož nemusí přesně odrážet rizika, kterým pacienti čelí, protože imunitní dysfunkce přetrvává i přes normalizaci CD4+. (65)

Nízký index mělo během prvního vyšetření celkem osm pacientů – č. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9. Zbylí pacienti č. 8 a 10 byli v normě, ve které přetrvávají po celou dobu monitorace, s výjimkou drobných propadů.

Studie Wei Lua a spol. zmiňuje, že dlouhodobá ART úspěšně obnovuje počty CD4+ u velké části HIV pacientů. Většina těchto pacientů však stále vykazuje trvalé zvýšení počtu CD8+ lymfocytů a také dysfunkci CD8+ kompartmentů. Studie také popisuje, že dřívější zahájení ART přispívá k rychlejší normalizaci poměru CD4/CD8. Naopak, u ART zahájené v chronické fázi onemocnění, je pozorováno pouze mírnější zvýšení CD4/CD8 poměru. (64)

Ke stejnému výsledku došla i studie Hocqueloux a spol., která vyzorovala normalizaci CD4/CD8 indexu během 6 let od počátku ART u 90% pacientů podchycených v primární HIV infekci. Do 10 let došlo k normalizaci téměř u všech pacientů. Naopak u většiny pacientů podchycených v chronické fázi HIV infekce k normalizaci CD4/CD8 poměru nedošlo ani po 14 letech virové suprese. (70)

K normalizaci došlo během jednoho měsíce u pacienta č. 9 a během tří měsíců i u pacienta č.1. Pomalejší cestu do referenční meze měli pacienti č. 3 a 6, a to po 6 a 9 měsících. U pacienta č. 5 došlo k normalizaci až poslední tři vyšetření z celkových padesáti. Zbylí pacienti č. 2, 4 a 7 setrvávají ve snížených hodnotách.

Pacienti č. 4 a 7 započali terapii ve stavu těžké imunodeficiency, tudíž je proces obnovy buněk pomalý, ale viditelný (viz. grafy č. 4 a 7). Pacient č. 7 se v jeden moment z původního indexu 0,15 dostal po sedmi letech od počátku terapie až na číslo 0,99. Pacient č. 2 je nonadherentní, tudíž je snížení původního indexu 0,5 na 0,01 v průběhu osmi let očekávaný.

ART u většiny pacientů potlačuje virovou nálož HIV v plazmě a zastavuje progresi do AIDS, což umožňuje progresivní obnovu CD4+ buněk spolu s přetrvávajícím zvýšením CD8+ buněk. Takové změny v průběhu času vedou k částečné nebo úplné normalizaci imunoregulačního indexu CD4/CD8. U pacientů, kteří mají tento index trvale nízký navzdory

dlouhodobému podstupování léčby tato skutečnost implikuje pokračující imunitní dysfunkci, zánětlivost a vysoké riziko nemocnosti a mortality nesouvisející s AIDS. (64)

ZÁVĚR

Bakalářská práce je zaměřena na vliv HIV na imunitní systém. Teoretická část je rozdělena do kapitol obsahujících základní informace o HIV a jeho účincích na lidský organismus. Praktická část je primárně zacílena na pozorování změn v zastoupení CD3+, CD4+ a CD8+ T-lymfocytů v průběhu onemocnění.

V průběhu akutní fáze infekce se může zvýšit celkový počet CD3+ lymfocytů v důsledku imunitní aktivace. Nicméně s progresí onemocnění dochází ke snižování celkového počtu T-lymfocytů. Nejvýraznější změny jsou pozorovány u CD4+ buněk, které jsou postupně vyčerpávány již od počátku infekce, což zvyšuje riziko infekčních onemocnění. K navýšení CD8+ buněk dochází v důsledku nadměrné stimulace HIV virem, ale s pokračující infekcí dochází postupně k jejich vyčerpání.

Výsledky značí nezbytnost sledování všech těchto markerů, spolu s dalšími složkami, pro posouzení stavu imunitního systému a celkového zdraví pacientů. Díky pravidelnému monitorování mohou lékaři odhadovat průběh onemocnění, úspěšnost terapie a dodržování léčby. Testováním na přítomnost specifických mutací viru HIV lze identifikovat rezistenci vůči antiretrovirové terapii a přizpůsobit tomu další terapeutické postupy. Pravidelná kontrola je také důležitá pro sledování vedlejších účinků léčby a k detekci komplikací, jako jsou například infekční onemocnění a malignity.

SEZNAM LITERATURY

1. HIV (Human Immunodeficiency Virus) Infection. *HealthLink BC*. [Online] 2021. Dostupné z: <https://www.healthlinkbc.ca/health-topics/hw151408>.
2. KLATT, Edward C. Pathology of HIV/AIDS. *The Internet Pathology Laboratory for Medical Education*. [Online] 2020. <https://webpath.med.utah.edu/AIDS2020.PDF>.
3. VOKURKA, Martin a HUGO, Jan. *Velký lékařský slovník*. 4. vydání. místo neznámé : Maxdorf, 2004. 8073450372.
4. JILICH, David a KULÍŘOVÁ, Veronika. *HIV infekce. Současné trendy v diagnostice, léčbě a ošetrovatelství*. Praha : Mladá Fronta, 2014.
5. VILLAZAON, Luis. Who really discovered HIV? *Science Focus*. [Online] Immediate Group Company. <https://www.sciencefocus.com/the-human-body/who-discovered-hiv/>.
6. HUANG, Jiegang et al. Western Blot-Based Logistic Regression Model for the Identification of Recent HIV-1 Infection: A Promising HIV-1 Surveillance Approach for Resource-Limited Regions. *BioMed Research International*. [Online] 2018. <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/4390318/>.
7. HIV/AIDS. *World Health Organization*. [Online] 30. Listopad 2021. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>.
8. PEETERS, M., AYOUBA, A. a VAN HEUVERSWIN, F. Human Immunodeficiency Viruses: Origin. [editor] Brian W.J. Mahy a Marc H.V. Van Regenmortel. *Encyclopedia of Virology*. Third Edition. místo neznámé : Elsevier, 2008, stránky 525-534.
9. PLESNÍK, Vladimír a MOORE, Jim. Záhada vzniku AIDS: (The Puzzling Origins of AIDS). *Zuova*. [Online] 2004. <https://www.zuova.cz/Content/files/articles/plesnik/smd210.pdf>. 0003-0996.
10. D'ARC, M., a další. 25 - Origin and Emergence of HIV/AIDS. *Genetics and Evolution of Infectious Diseases*. Second Edition. místo neznámé : Elsevier, 2017, stránky 573-599.

11. MAHY, Brian W.J. a VAN REGENMORTEL, Marc H.V. *Encyclopedia of Virology*. Third Edition. místo neznámé : Elsevier, 2008. 978-0-12-374410-4.
12. *Simian Immunodeficiency Virus seroreactivity in inhabitants from rural Cameroon frequently in contact with non-human primates*. FILIPPONE, Claudia, a další. [editor] Richard Kuhn. místo neznámé : Elsevier, 2017, Sv. 503, stránky 76-82. 0042-6822.
13. *Structural biology of HIV*. TURNER, Brian G. a SUMMERS, Michael F. [editor] Peter Wright. 1, místo neznámé : Elsevier, Journal of Molecular Biology, Sv. 285, stránky 1-32. 0022-2836.
14. *The Biology and Evolution of HIV*. HUTCHINSON, Janis Faye. 1, místo neznámé : Annual Reviews, 2001, Annual Review of Anthropology, Sv. 30, stránky 85-108. 0084-6570.
15. SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie - Pro studenty zdravotnických oborů*. Druhé vydání. Praha : Grada, 2014. str. 248. 978-80-247-4771-2.
16. SCHAECHTER, Moselio. *Encyclopedia of Microbiology*. [editor] Moselio Schaechter. místo neznámé : Academic Press, 2009. 978-0-12-373944-5.
17. LEVY, Jay. *HIV and the Pathogenesis of AIDS*. Third Edition. místo neznámé : ASM Press, 2007. str. 752. 978-1-555-81393-2.
18. SHORS, Teri. *Understanding Viruses*. Third Edition. místo neznámé : Jones & Bartlett Learning, 2016. 978-1-28-402592-7.
19. *How does male circumcision protect against HIV infection?* SZABO, Robert a SHORT, Roger V. místo neznámé : British Medical Association, 2000, The BMJ, Sv. 320, stránky 1592–1594. 0959-8138.
20. *HIV Prevalence and Correlations in Prisons in Different Regions of the World: A Review Article*. GOLROKHI, Raheleh, a další. [editor] Michael I. Bukrinsky. místo neznámé : Bentham Science Publishers B.V., 2018, Open AIDS Journal, Sv. 12, stránky 81-92. 1874-6136.
21. HÁJEK, Marcel, a další. *HIV/AIDS v chirurgických oborech*. Praha : Grada, 2004. 80-247-0857-4.

22. BARTUŇKOVÁ, Jiřina, ŠEDIVÁ, Anna a JANDA, Aleř. *Imunodeficiencie*. 2., přepracované a doplněné vydání . Praha : Grada, 2007. str. 256. 978-80-247-1980-1.
23. *Immunobiology of Human Immunodeficiency Virus Infection*. TRIPATHI, P. a AGRAWAL, S. 4, místo neznámé : Medknow Publications, 2007, *Indian Journal of Medical Microbiology*, Sv. 25, stránky (311-322). 0255-0857.
24. DISPEZIO, Michael Anthony a BUTLER, Jeanine Isabel. *The Science of HIV*. Arlington : National Science Teachers Association, 1997. str. 184. 978-0-87-355160-1.
25. TANG, Min, a další. *CD3+T, CD4+T, CD8+T, and CD4+T/CD8+T Ratio and Quantity of $\gamma\delta$ T Cells in Peripheral Blood of HIV-Infected/AIDS Patients and Its Clinical Significance*. 8. Prosinec 2021.
26. *Molecular biology of the human immunodeficiency virus: current and future targets for intervention*. KROGSTAD, Paul. 4, místo neznámé : Elsevier, 2003, *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, Sv. 14, stránky 258-268. 1045-1870.
27. PREVEDIG. HIV (anti 1,2 + p24 antigen). *Prevedig*. [Online] Prevedig. <https://www.prevedig.cz/infekcni-serologie/109-laboratorni-metody/laboratorni-metody-biochemie/537-hiv-anti-1-2-p24-antigen.html>.
28. SOUČEK, Miroslav, ŠPINAR, Jindřich a SVAČINA, Petr. *Vnitřní lékařství pro stomatology*. Praha : Grada, 2005. str. 380. 80-247-1367-5.
29. GALASSO, George J., WHITLEY, Richard J. a MERIGAN, Thomas C. *Antiviral Agents and Human Viral Diseases*. Subsequent edition. místo neznámé : Lippincott Williams & Wilkins, 1997. 978-03-975-1709-1.
30. *Laboratory diagnostics for HIV infection*. BUTTÒ, Stefano, a další. 1, místo neznámé : Istituto Superiore di Sanità, 2010, *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, Sv. 46, stránky 24–33. 0021-2571.
31. BARTUŇKOVÁ, Jiřina a PAULÍK, Martin. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Praha : Grada, 2011. 978-80-247-3533-7.
32. Bio-Rad. NEW LAV BLOT I - 18 stanovení: KONFIRMAČNÍ SOUPRAVA K DETEKCI PROTILÁTEK ANTI-HIV1 V SÉRU/PLASMĚ IMUNOBLOTINGEM.

Bio-Rad. [Online] 2009. https://commerce.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/cs/883572_CZ.pdf.

33. LabGuide.cz. Western Blot. *LabGuide.cz – Průvodce laboratoří.* [Online] <https://labguide.cz/metody/western-blot/>.

34. *The laboratory diagnosis of HIV infections.* FEARON, Margaret. 1, místo neznámé : Hindawi, Leden 2005, *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, Sv. 16, stránky 26-30. 1712-9532.

35. TRUANT, Allan L., a další. *Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology.* Second Edition. místo neznámé : Wiley-Blackwell, 2016. 978-1118131121.

36. *HIV diagnostic tests: an overview.* IWEALA, Onyinye I. místo neznámé : Elsevier, 2004, *Contraception*, Sv. 70, stránky 141–147. 0010-7824.

37. LabGuide.cz. PCR. *LabGuide.cz – Průvodce laboratoří.* [Online] LabGuide.cz. <https://labguide.cz/metody/pcr/>.

38. *CD4 immunophenotyping in HIV infection.* BARNETT, David, a další. 11, místo neznámé : Nature Publishing Group, 2008, *Nature Reviews Microbiology*, Sv. 6, stránky 7-11. 1740-1526.

39. *Průtoková cytometrie 2 - klinické využití.* ŠEBEK, J. Pardubice : Stapro s. r. o. a Česká společnost klinické biochemie, 2014, *Bulletin FONS*, Sv. 4, stránky 8-12. 1211-7137.

40. WARD, John W. *AIDS Testing: a comprehensive guide to technical, medical, social, legal, and management issues.* [editor] Gerald SCHOCHETMAN a Richard J. GEORGE. New York : Springer Science & Business Media, 1994. 9780387942919.

41. *Průtoková cytometrie v mikrobiologii.* LOCHMANOVÁ, A., a další. Praha : Prager Publishing, 2017, *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*, Sv. 4, stránky 182-188. 1210-7913.

42. SAX, Paul E., COHEN, Calvin J. a KURITZKES, Daniel R. *HIV Essentials 2014.* Seventh Edition. Burlington : Jones & Bartlett Learning, 2014. 978-1284051001.

43. IKEM. Buňky CD4+Th lymfocyty v krvi. *IKEM*. [Online] IKEM. https://www2.ikem.cz/plm_lp/_LP_06614-L0000006.htm.
44. *Affordable CD4+-T-Cell Counting by Flow Cytometry: CD45 Gating for Volumetric Analysis*. JANOSSY, George, a další. 5, místo neznámé : American Society for Microbiology, Zář 2002, *Clinical and Vaccine Immunology*, Sv. 9, stránky 1085–1094. 1556-6811.
45. *Current status and prospects of HIV treatment*. CIHLAR, Tomas a FORDYCE, Marshall. místo neznámé : Elsevier, 2016, *Current Opinion in Virology*, Sv. 18, stránky 50-56. 1879-6257.
46. KEMNIC, Tyler R. a GULICK, Peter G. HIV Antiretroviral Therapy. *StatPearls*. místo neznámé : StatPearls Publishing, 2022. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513308/>.
47. SEDAGHAT, Ahmad R. a spol. T Cell Dynamics and the Response to HAART in a Cohort of HIV-1-Infected Elite Suppressors. *Clinical Infectious Diseases*. 2009. Sv. 49, 11. 1058-4838.
48. JENTSCH-ULLRICH, Kathleen a spol. Lymphocyte subsets' reference ranges in an age- and gender-balanced population of 100 healthy adults—A monocentric German study. *Clinical Immunology*. 2005. Sv. 116, 2. 1521-6616.
49. MARGOLICK, Joseph B. a spol. Failure of T-cell homeostasis preceding AIDS in HIV-1 infection. *Nature Medicine*. 1995. Sv. 1, 7. 1546-170X.
50. PHILLIPS, Andrew N., LEE, Christine A. a ELFORD, Jonathan a spol. The Cumulative Risk of AIDS as the CD4 Lymphocyte Count Declines. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. New York : Raven Press, 1992. 2. 0894-9255.
51. DOITSCH, Gilad, a další. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature*. 2014. 505. 1476-4687.
52. JONES, Gareth a POWER, Christopher. Regulation of neural cell survival by HIV-1 infection. *Neurobiology of Disease*. 2006. Sv. 21, 1. 0969-9961.

53. CASSOL, Edana, a další. Monocyte-derived macrophages and myeloid cell lines as targets of HIV-1 replication and persistence. *Journal of Leukocyte Biology*. 2006. Sv. 80, 5. 0741-5400.
54. DOITSH, Gilad a GREENE, Warner C. Dissecting How CD4 T Cells Are Lost During HIV Infection. *Cell Host & Microbe*. 2016. Sv. 19, 3. 1931-3128.
55. HELLEBERG, Marie, a další. CD4 Decline Is Associated With Increased Risk of Cardiovascular Disease, Cancer, and Death in Virally Suppressed Patients With HIV. *Clinical Infectious Diseases*. 2013. Sv. 57, 2. 1058-4838.
56. GUO, Fu-Ping a spol. Baseline naive CD4+ T-cell level predicting immune reconstitution in treated HIV-infected late presenters. *Chinese medical journal*. 2016. Sv. 129, 22. 2683-2690.
57. PAKKER, Nadine G., NOTERMANS, Daan W. a de BOER, Rob J. a spol. Biphasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: a composite of redistribution and proliferation. *Nature Medicine*. 1998. 2. 1078-8956.
58. CAO, Wei, a další. Elevation and persistence of CD8 T-cells in HIV infection: the Achilles heel in the ART era. *Journal of the International AIDS Society*. 2016. 1. 1758-2652.
59. DOUEK, Daniel C., PICKER, Louis J. a KOUP, Richard A. T Cell Dynamics in HIV-1 Infection. *Annual Review of Immunology*. 2003. Sv. 21, 1, stránky 265-304.
60. JASON, J. a INGE, K. L. Modulation of CD8 and CD3 by HIV or HIV Antigens. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2001. Sv. 53, 3. 1365-3083.
61. KRANTZ, Elizabeth M., a další. Elevated CD8 Counts During HAART are Associated with HIV Virologic Treatment Failure. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. 2011. Sv. 57, 5. 1525-4135.
62. APPAY, V a SAUCE, D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *The Journal of Pathology*. 2008. Sv. 214, 2. 1096-9896.
63. SAUTER, Rafael, a další. CD4/CD8 ratio and CD8 counts predict CD4 response in HIV-1-infected drug naive and in patients on cART. *Medicine (Baltimore)*. 2016. 42. 0025-7974.

64. LU, Wei, a další. CD4:CD8 ratio as a frontier marker for clinical outcome, immune dysfunction and viral reservoir size in virologically suppressed HIV-positive patients. *Journal of the International AIDS Society*. 2015. Sv. 18, 1. 1758-2652.
65. McBRIDE, Joseph A a STRIKER, Rob. Imbalance in the game of T cells: What can the CD4/CD8 T-cell ratio tell us about HIV and health? *PLOS Pathogens*. 2. Listopad 2017. Sv. 13, 11. 1553-7374.
66. ZHAO, Nange a spol. CD3+T, CD4+T, CD8+T, and CD4+T/CD8+T Ratio and Quantity of $\gamma\delta$ T Cells in Peripheral Blood of HIV-Infected/AIDS Patients and Its Clinical Significance. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*. 2021. 1748-670X.
67. MARTÍNEZ-SANZ, Javier, a další. Expanding HIV Clinical Monitoring: The Role of CD4, CD8, and CD4/CD8 Ratio in Predicting Non-AIDS Events. *medRxiv*. 2023.
68. MUSSINI, Cristina a spol. CD4/CD8 ratio normalisation and non-AIDS-related events in individuals with HIV who achieve viral load suppression with antiretroviral therapy: an observational cohort study. *The lancet. HIV*. 2015. Sv. 2, 3. 2352-3018.
69. DAVY-MENDEZ, Thibaut a spol. ACUTE HIV INFECTION AND CD4/CD8 RATIO NORMALIZATION AFTER ANTIRETROVIRAL THERAPY INITIATION. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. 2018. Sv. 79, 4. 1525-4135.
70. HOCQUELOUX, Laurent, AVETTAND-FÈNOËL, Véronique a JACQUOT, Sophie a spol. Long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection is key to achieving both low HIV reservoirs and normal T cell counts. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013. Sv. 68, 5. 0305-7453.
71. LUMITOS AG. *Gay-related immune deficiency*. [Online] https://www.bionity.com/en/encyclopedia/Gay-related_immune_deficiency.html#_ref-CDC1_0/.
72. HUSA, Petr, KRBKOVÁ, Lenka a BARTOŠOVÁ, Drahomíra. *Infekční lékařství: Učební text pro studenty všeobecného lékařství*. První vydání. Brno : Masarykova univerzita, 2011. str. 160. 978-80-210-5660-2.