zlom transfuze 4 14.12.2005 11:55 Stránka 141
proLékaře.cz | 9.12.2026

Kombinovaný test pro vyšetřování antigenu a protilátky proti viru hepatitidy C

Masopust J.[1], Kracíková J.[2], Němeček V.[3], Procházková R.[4]
[1] Transfuzní oddělení, Masarykova nemocnice v Ústí nad Labem
[2] Transfuzní oddělení, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha
[3] Národní referenční laboratoř pro virové hepatitidy, Státní zdravotní ústav, Praha
[4] Transfuzní oddělení, Krajská nemocnice Liberec

Souhrn
Úvod. **Virová hepatitida C zůstává i přes zavedení a výrazné zdokonalení testů pro detekci anti-HCV u dárců krve a krevních složek významným rizikem potransfuzní hepatitidy. Cílem této práce bylo zhodnocení možnosti zavedení kombinovaného testu pro detekci HCV antigenu a anti-HCV v ČR.** ***Soubor a metody.*** **V lednu až dubnu 2005 jsme vyšetřili 1164 sér dárců krve/krevních složek (soubor 1) testem Monolisa HCV Ag-Ab Ultra (BioRad) a Monolisa anti-HCV Plus Version 2 (BioRad), dále testem Monolisa HCV Ag-Ab Ultra 106 HCV RNA pozitivních a anti-HCV pozitivních sér (soubor 2), séra 15 pacientů s prokázanou HBV infekcí (soubor 3), 41 sér reaktivních ve 3 EIA anti-HCV testech nebo RIBA 3.0 HCV pozitivních (soubor 4), 109 sér reaktivních v alespoň jednom anti-HCV EIA testu a RIBA 3.0 nejasných nebo negativních (soubor 5), panel s nízkým titrem anti-HCV (soubor 6) a panel se smíšeným titrem anti-HCV (soubor 7) a 2 séra dárce HCV RNA pozitivní, anti-HCV negativní (soubor 8).** ***Výsledky.*** **Výsledky vyšetření souborů sér testem Monolisa HCV Ag-Ab Ultra, procento shodných nálezů uvedeno v závorce. Soubor 1: 1krát nespecifická reaktivita pouze v testu Monolisa HCV Ag-Ab Ultra (specificita 99,91 %); soubor 2: 106 sér pozitivních (100 %); soubor 3: 15 sér negativních (100 %); soubor 4: 38 reaktivních (92,7 %) a 3 negativní (7,3 %); soubor 5: 40 sér anti-HCV (BioRad) reaktivních a HCV Ag-Ab (BioRad) negativních (36,7 %), 23 sér anti-HCV (BioRad) negativních a HCV Ag-Ab (BioRad) reaktivních (21,1 %), 12 sér v obou testech reaktivních a 34 sér v obou testech negativních; soubor 6 a 7: všechny výsledky souhlasné s panelem; soubor 8: obě séra v testu HCV Ag-Ab (BioRad) negativní (S/CO 0,13 a 0,58).** ***Diskuse a závěr.*** **Naše pilotní studie ukazuje, že test Monolisa HCV Ag-Ab Ultra je vysoce specifický. Zkracuje diagnostické okno oproti protilátkovému testu o 17-49 dní (literární údaje), citlivost testu se zvyšuje rozšířením intervalu „šedé zóny" od S/CO 0,50. Je vhodné uvažovat o zavedení kombinovaného testu HCV Ag-Ab do transfuzní praxe v ČR. Pro reálné hodnocení prospěchu testování HCV antigenu kombinovaným testem jsou potřebné další studie s rutinním testováním dárců krve a krevních složek.**
Klíčová slova: HCVcAg, anti-HCV, dárci krve, imunoenzymatický test

Summary
Masopust J., Kracíková J., Němeček V., Procházková R.: A combined antigen-antibody HCV detection assay

Introduction. **Besides implementation and considerable improvement of screening tests for anti-HCV detection in blood and blood components donors, hepatitis C virus remains the significant risk of post-transfusion hepatitis. The aim of our study was to evaluate the possibilities of introduction the assay for combined detection of HCV antigen and HCV antibodies in the Czech republic.** ***Materials and methods.*** **From January to April 2005 1164 serum samples of blood and blood components donors were tested simultaneously by Monolisa HCV Ag-Ab Ultra (BioRad) and Monolisa anti-HCV Plus Version 2 (BioRad) (group 1). Following samples were tested by Monolisa HCV Ag-Ab Ultra: 106 HCV RNA positive and anti-HCV positive samples (group 2); 15 samples from patients with proved HBV infection (group 3); 41 samples reactive in 3 EIA anti-HCV tests or RIBA 3.0 HCV positive (group 4); 109 samples reactive at least in one anti-HCV EIA test and RIBA 3.0 indeterminate or negative (group 5); panel of samples with low titre anti-HCV (group 6); panel of samples with mixed titre anti-HCV (group 7) and 2 samples from blood donor HCV RNA positive, anti-HCV negative (group 8).** ***Results.*** **Group 1: one unspecific reactivity only in Monolisa HCV Ag-Ab Ultra (specificity 99,91 %); group 2: 106 positive samples (100 %); group 3: 15 negative samples (100 %); group 4: 38 reactive samples (92,7 %) a 3 negative samples (7,3 %); group 5: 40 samples anti-HCV (BioRad) reactive and HCV Ag-Ab (BioRad) negative (36,7 %), 23 samples anti-HCV (BioRad) negative and HCV Ag-Ab (BioRad) reactive (21,1 %), 12 samples reactive in both tests and 34 samples negative in both tests; group 6 a 7: all results were accordant with panels; group 8: both samples were negative by HCV Ag-Ab (BioRad) (S/CO 0,13 a 0,58).** ***Discussion.*** **Our pilot study shows that Monolisa HCV Ag-Ab Ultra assay is highly specific. It shortens diagnostic window in comparison to antibody assay by 17-49 days (literature data), test sensitivity is increased by extension of the interval of „the grey zone" from S/CO 0,50. It is suitable to consider the introduction of combined HCV antigen-antibody assay in transfusion service in the Czech republic. However, further studies with routine testing of blood and blood components donors are necessary for real evaluation of benefit of HCV antigen testing.**
Key words: HCVcAg, anti-HCV, blood donors, enzyme-linked immunosorbent assay

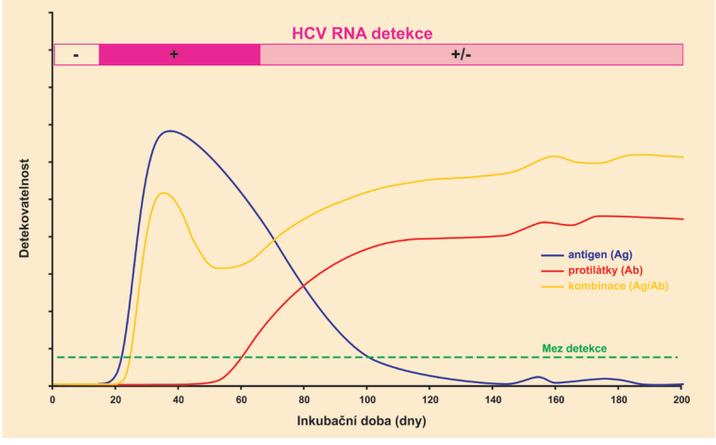
Trans. Hemat. dnes, 11, 2005, No. 4, p. 141–147.

zlom transfuze 4 14.12.2005 11:55 Stránka 142
proLékaře.cz | 9.12.2026

Úvod

Po zavedení rutinního vyšetřování hepatitidy B u dárců krve a krevních složek (dále jen „dárců“) stále zbylo burcující riziko non-A, non-B potransfuzní hepatitidy (1). Testování ALT a anti-HBc toto riziko nespecificky mírně snižovalo (1, 2), což ovšem nebylo všemi studiemi jednoznačně potvrzeno (3, 4). Původce převážné části těchto potransfuzních hepatitid – virus hepatitidy C (HCV) – byl objeven v roce 1988 s nástupem molekulárně biologických metod (5, 6).

Virová hepatitida typu C i přes zkvalitňování náboru dárců, precizování výběrových kritérií při posuzování způsobilosti dárce k odběru (rizikové faktory, riziková chování) (7, 8) a zdokonalování screeningových testů stále patří k závažným komplikacím transfuzí krve či krevních složek. Ročně je ve světě infikováno okolo 1 milionu lidí (9–11), přenos transfuzí však patří k minoritním způsobům přenosu (12). Klinický i ekonomický význam hepatitidy C je v jejím výrazném sklonu přecházet do chronicity (v 50–80 % případů) často s těžkým postižením jater nebo i vznikem primárního jaterního karcinomu (12). Moderní léčba tato rizika sice snižuje, ale je značně nákladná.



Obr. 1. Průběh známek HCV infekce.
(upraveno podle Lambert N, Vermet L, Bordier M, et al. Performance features of the new Bio-Rad HCV antigen and antibody assay. XXVIIIth Annual Congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT), Edinburgh 2004; Abstract P4.22).

Nepříjemné je dlouhé imunologické (diagnostické) okno (obr. 1). Ačkoliv předpisy Rady Evropy a Evropské unie (7, 8) doporučují u dárců krve či krevních složek jako závazné pouze testování anti-HCV, mnoho zemí doplnilo paletu povinných testů o molekulárně-biologické vyšetření HCV RNA či antigenu HCV.

V České republice se o dalším konkrétním postupu v oblasti screeningu hepatitidy C u dárců zatím nerozhodlo.

Soubor a metoda

Vzorky

V lednu až dubnu 2005 jsme na transfuzních odděleních Fakultní nemocnice Královské Vinohrady v Praze, Krajské nemocnice Liberec a Masarykovy nemocnice v Ústí nad Labem provedli vyšetření 1164 krevních vzorků dárců kombinovaným testem pro detekci anti-HCV a antigenu HCV (HCV Ag-Ab) (soubor 1). Paralelně byly tyto krevní vzorky vyšetřeny i protilátkovým testem.

V Národní referenční laboratoři pro virové hepatitidy byla vyšetřena testem HCV Ag-Ab séra zároveň HCV RNA i anti-HCV pozitivní (n = 106) (soubor 2), dále séra pacientů s prokázanou HBV infekcí (n = 15) (soubor 3), séra reaktivní ve 3 EIA testech pro detekci anti-HCV nebo RIBA 3.0 HCV pozitivní (n = 41) (soubor 4), séra reaktivní v minimálně jednom anti-HCV EIA testu a RIBA 3.0 nejasná (indeterminate) nebo negativní (n = 109) (soubor 5), soubor sér panelu BBI PHV-102 low titer anti-HCV (n = 15) (soubor 6), soubor sér panelu BBI PHV-203 mix titer anti-HCV (n = 25) (soubor 7) a 2 séra dárce HCV RNA pozitivní, anti-HCV negativní (soubor 8) (obě séra byla odebrána témuž dárci v intervalu 23 dní).

Vyšetření anti-HCV protilátkovým testem

Toto vyšetření jsme prováděli pomocí testu Monolisa® anti-HCV Plus Version 2 (Bio-Rad) podle postupu uvedeného v návodu výrobce.

Další testy (použité v Národní referenční laboratoři pro virové hepatitidy): Axsym HCV (Abbott), Ortho HCV 3.0 ELISA (Ortho). Byl dodržen postup podle návodů výrobců.

Vyšetření anti-HCV a HCV Ag kombinovaným testem

Princip testu: Monolisa® HCV Ag-Ab ULTRA je dvoukrokový imunoenzymatický test (EIA), založený na kombinaci nepřímého testu pro detekci protilátek a sendvičového testu pro detekci antigenu HCV s monitorováním přidání vzorku a barevně odlišenými reagenciemi. Povrch jamek destičky je potažen monoklonálními protilátkami proti kapsidě HCV, dvěma rekombinantními antigeny oblasti NS3 a jedním rekombinantním antigenem z nestrukturální oblasti NS4 a modifikovaným kapsidovým peptidem strukturální oblasti genomu HCV. Kapsidový HCV je detekován druhou monoklonální protilátkou konjugovanou s biotinem, reagující se streptavidin peroxidázou. V téže jamce jsou pak detekovány protilátky anti-HCV pomocí IgG proti lidskému IgG konjugované s peroxidázou. Použité konjugáty jsou: konjugát 1 (myší monoklonální biotinovaná protilátka proti kapsidě HCV; tato monoklonální protilátka nereaguje s modifikovaným kapsidovým antigenem HCV, kterým je potažena mikrotitrační destička), konjugát 2 (myší protilátky proti lidskému IgG značené peroxidázou a streptavidin značený peroxidázou).

Vlastní postup: 1. Do jamek mikrotitrační desky se napipetuje konjugát 1, testované vzorky a kontrolní séra. 2. Po inkubaci při 37 °C po dobu 90 minut a promytí se do jamek napipetují peroxidázou značené protilátky proti

zlom transfuze 4 14.12.2005 11:55 Stránka 143
proLékaře.cz | 9.12.2026

lidskému IgG a konjugát 2.

3. Po 30 minutách inkubace při 37 °C se nenavázaný enzymový konjugát odstraní promytím a komplex antigen-protilátka se prokáže přidáním substrátu.

4. Po 30 minutách se reakce zastaví a hodnoty optické denzity se změří pomocí spektrofotometru při vlnové délce 450/620-700 nm. Měření optické denzity vzorku umožňuje zjistit přítomnost nebo nepřítomnost protilátek nebo kapsidového antigenu HCV. Intenzita zabarvení je úměrná množství protilátek nebo antigenu HCV, navázaných na pevné fázi.

Konfirmační testování

Opakovaně reaktivní vzorek byl odeslán ke konfirmačnímu vyšetření do Národní referenční laboratoře pro virové hepatitidy. Ke konfirmaci byly použity 3 EIA anti-HCV testy: Axsym HCV (Abbott), Monolisa anti-HCV Plus Version 2 (BioRad), Ortho HCV 3.0 ELISA (Ortho), dále konfirmační test Chiron RIBA HCV 3.0 SIA (Chiron) a test pro detekci HCV RNA Cobas Amplicor HCV ver. 2 (Roche).

Statistická metoda

Incidence sérokonverzí u opakovaných dárců krve a krevních složek: počet konfirmačně potvrzených pozitivit anti-HCV u opakovaných dárců v daném roce / osobo-roky v riziku (13–15).

Odhadované reziduální riziko přenosu HCV infekce anti-HCV negativní krví u opakovaných dárců krve: incidence sérokonverzí x průměrná délka diagnostického okna ve dnech / 365 (16).

Diagnostické okno: doba mezi infekcí a možností tuto infekci detekovat daným testem. Obvykle se ke kalkulaci pro protilátkové testy používá délka diagnostického okna 66 dní (13, 14). Pro kombinovaný test jsme uvažovali délku diagnostického okna 38 dní (délka po odečtení průměrného zkrácení 17–49 dní udávaného níže uvedenými autory) (17–21).

Osobo-roky v riziku: počet odběrů u opakovaných dárců v daném roce / průměrný časový interval mezi odběry (22).

Opakovaný dárce: v daném roce daroval minimálně dvakrát (15, 23, 24).

Průměrný časový interval mezi odběry: suma časových intervalů mezi prvním a posledním odběrem všech opakovaných dárců / počet opakovaných dárců (23).

Protože v České republice chybí data o počtu opakovaných dárců, kteří v daném roce darovali, ani se nesledují údaje o časových intervalech, provedli jsme odhad z dat, získaných z našich 3 zařízení transfuzní služby, třebaže mohou být ovlivněna chybou malých čísel (pouze cca 11 % všech odběrů v ČR):

- počet odběrů u opakovaných dárců za rok / počet opakovaných dárců za rok (14, 15).

Výsledky

Výsledky vyšetření souborů sér testem Monolisa HCV Ag-Ab Ultra, procento shodných nálezů je uvedeno v závorce.

Tab. 1. Výsledky testování vzorků dárců krve a krevních složek na průkaz anti-HCV a HCVcAg.

	protilátkový test	kombinovaný test
Počet vzorků	1164	1164
Opakovaně reaktivní	0	1
Pozitivní*	0	0
Specificita (%)	100	99,91

Vysvětlivky: HCVcAg = kapsidový antigen viru hepatitidy C; protilátkový test = test pro vyšetření anti-HCV; kombinovaný test = test pro vyšetřování anti-HCV a HCVcAg; * = potvrzené konfirmačním testem

Soubor 1: z vyšetřených vzorků dárců krve a krevních složek byl opakovaně reaktivní 1 vzorek pouze v kombinovaném testu (tab. 1). Reaktivita nebyla potvrzena v Národní referenční laboratoři pro virové hepatitidy jakožto pozitivní (či nejasná). Specificita testu byla v našem souboru 99,91 %. Protože soubor je relativně malý bez významného počtu hraničních a pozitivních hodnot, nelze provádět skutečné porovnání testů co do schopnosti diskriminace do pozitivit a negativit.

Soubor 2: u všech sér HCV RNA i anti-HCV pozitivních byla kombinovaným testem pozitivita potvrzena.

Soubor 3: 15 sér negativních (100 %), nespecifická reaktivita nebyla prokázána.

Soubor 4: 38 reaktivních sér (92,7 %) a 3 séra negativní (7,3 %). Podrobné výsledky vyšetření u 3 negativních vzorků jsou uvedeny v tabulce 2.

Tab. 2. Výsledky EIA testů AxSYM, Monolisa Plus, Ortho (hodnoty S/CO), konfirmačního testu RIBA 3.0 a COBAS Amplicor HCV PCR u 3 vzorků negativních v testu Monolisa HCV Ag-Ab Ultra. (*Kurzivou jsou uvedeny výsledky druhých odběrů příslušných osob.*)

Č. séra	ULTRA	AXSYM	PLUS	ORTHO	RIBA 3.0	HCV RNA
640/04	negativní	3,910	0,350	0,880	pozitivní	NT
641/04	*negativní*	*3,680*	*0,380*	*0,930*	*pozitivní*	*NT*
806/04	negativní	1,2	0,920	0,950	pozitivní	NEG.
1810/04	*negativní*	*1,050*	*1,080*	*0,580*	*pozitivní*	*NT*
2269/04	negativní	3,1	2,110	1,100	indeterm.	NEG.

Vysvětlivky: indeterm. = indeterminate (nejasný, neurčitý)

Soubor 5: výsledky jsou uvedeny v tabulce 3. Výsledky ukazují, že kombinovaný test ve srovnání s protilátkovým testem lépe diskriminuje do negativit.

Soubory 6 a 7: výsledky vyšetření citlivostních panelů byly souhlasné s deklarovanými údaji (13 pozitivních, 2 negativní nálezy v panelu 6 a 22 pozitivních, 3 negativní nálezy v panelu 7).

Soubor 8: obě séra byla kombinovaným testem negativní (S/CO 0,13 a 0,58).

Průměrný časový interval mezi odběry (2004): 38774 odběrů / 15840 dárců = 2,45 odběru na dárce/rok; časový interval = 1 / 2,45 = 0,41 roku.

Osobo-roky v riziku: $3{,}718 \times 10^5$ odběrů / 0,41 = $9{,}1 \times 10^5$ ($5{,}25 \times 10^5$ odběrů za rok 2004 – počet odběrů u nových dárců) x 0,75 = $3{,}718 \times 10^5$ odběrů (0,75 = odhadovaný podíl opakovaných dárců podle definice uvedené výše za použití dat z našich 3 zařízení transfuzní služby) – využita statistika ÚZIS (25).

Odhadovaná incidence sérokonverzí u opakovaných dárců krve v ČR:

zlom transfuze 4 14.12.2005 11:55 Stránka 144
proLékaře.cz | 9.12.2026

Tab. 3. Porovnání výsledků vyšetření sér se závěrem konfirmace „nejasný" testy Monolisa® anti-HCV Plus Version 2 a Monolisa® HCV Ag-Ab ULTRA (n = 109).

MONOLISA	HCV Ag-Ab Ultra reaktivní	HCV Ag-Ab Ultra negativní
HCV Plus reaktivní	12	40
HCV Plus negativní	23	34

Z **23** HCV Plus **negativní** /Ultra **reaktivní** je v RIBA 3.0 **16 indeterminate** **7 negativních**

Z **40** HCV Plus **reaktivní** /Ultra **negativní** je v RIBA 3.0 **13 indeterminate** **27 negativních**

Všechny vzorky „indeterminate" byly vyšetřeny PCR a byly **HCV RNA negativní.**
(Indeterminate = nejasný, neurčitý).

Tab. 4. Zavádění testování HCV infekce u dárců krve a krevních složek.

test	svět (rok)	ČR (rok)
anti-HCV 1. generace	1990 (USA, Německo) (27, 35)	-
anti-HCV 2. generace	1991 (USA, Německo) (15, 35)	1992
anti-HCV 3. generace	1994 (Německo) (35)	1994-1995
HCV RNA (PCR)	1998-1999 (USA) (40, 52)	-
	1999 (Kanada, Německo, Japonsko)	
	(37, 47, 48, 50)	
	2000 (Austrálie) (38)	
	2001 (Francie) (23)	
	2002 (Itálie, Polsko) (51, 53, 55)	
HCVcAg	2002 (Polsko, Španělsko)	-
	(51, 53, 61)	

Vysvětlivky: HCVcAg = kapsidový antigen viru hepatitidy C

71 / 9,1x10^5 = 7,8 na 1x10^5 osobo-roků.
Odhadované reziduální riziko přenosu HCV infekce anti-HCV negativní krví v ČR u opakovaných dárců krve: (7,8 x 66) / 365 = 1,41 na 1x10^5 odběrů; tj. 14,1 na 1x10^6 odběrů; při počtu cca 500 tisíc odběrů/rok se jedná o zhruba 7 rizikových odběrů ročně.

Odhadované reziduální riziko přenosu HCV infekce anti-HCV negativní a HCVcAg negativní (kombinovaným testem) krví v ČR: (7,8 x 38) / 365 = 0,81 na 1x10^5 odběrů; tj. 8,1 na 1x10^6 odběrů; při počtu cca 500 tisíc odběrů/rok se jedná o zhruba 4 rizikové odběry ročně.

Odhadované reziduální riziko při použití kombinovaného testu je nižší o 3 rizikové odběry za rok.

Diskuse a závěr

Hepatitida C vzhledem ke své progresivní povaze a vzhledem k tomu, že dosud neexistuje možnost prevence nákazy HCV účinným očkováním, stále patří k závažným „rizikovým infekcím" v transfuzní službě. Incidence anti-HCV u dárců krve a krevních složek v Evropě kolísá: např. ve Francii 0,6 (26), v Německu 2,3 (27), ve Španělsku 3,23 (23), v Itálii 4,1 (24, 28), v ČR 7,8 na 1x10^5 osobo-roků. Relativně vysoká incidence v ČR by však mohla být zkreslena tím, že se v celostátní statistice ČR nesleduje počet dárců, kteří darovali v daném roce více než 1krát a pro výpočet byl použit hrubý odhad. Při použití delšího sledovaného období než 1 rok by došlo k prodloužení průměrného časového intervalu mezi odběry. Nejistá je i validita počtu vyřazených dárců pro pozitivitu anti-HCV, protože v *Ročním výkazu o činnosti ZZ* pro účely ÚZIS ČR je tento údaj nepřesně definován a jsou sem zařazováni i dárci s opakovaně nespecificky reaktivními výsledky (29). Do počtu anti-HCV pozitivních dárců jsou zahrnuti i dárci, kteří v daném roce absolvovali pouze 1 odběr. V NRL pro virové hepatitidy vzhledem k insuficientním údajům z terénu není často možné odlišit vzorky dárců a pacientů, zasílané ze zařízení transfuzní služby či jejich smluvní laboratoře. Dá se tedy předpokládat, že incidence konfirmované pozitivity anti-HCV je v ČR nižší, než je výše uvedená.

Zavedení rutinního vyšetřování anti-HCV EIA testy do algoritmu screeningového testování dárců počátkem 90. let minulého století (tab. 4) rapidně snížilo výskyt potransfuzní hepatitidy. Testy první generace byly zatíženy vysokou frekvencí falešně reaktivních i negativních výsledků, reziduální riziko přenosu infekce transfuzí bylo vysoké (např. v USA 1 na 1700 odběrů) (30, 31).

Zvýšenou senzitivitu a specificitu přinesly testy druhé generace; diagnostické okno zkrátily na 82 dní a reziduální riziko se výrazně snížilo (např. v USA 1 na 103 000 odběrů) (16, 31).

V současnosti používané testy 3. generace jsou obdařeny vysokou specificitou a senzitivitou (32). Nejcitlivějšími testy se diagnostické okno zkrátilo v průměru až na 66-70 dní (38-94) (33–37).

Reziduální riziko přenosu HCV infekce podáním anti-HCV negativního transfuzního přípravku při testování pouze anti-HCV se odhadovalo ve Francii na 1,16 (26); v Německu 1,79-5,0 (22, 27, 38, 39), v Austrálii 2,5–5,0 (40), ve Velké Británii 4,0 (41), v Itálii 4,35–7,9 (24, 28), ve Španělsku 6,7 (23), v USA 6,2–9,8 (13, 16, 42) na 1x10^6 odběrů. V průběhu let se riziko přenosu HCV infekce snižovalo (např. ve Francii 2,7 v letech 1996–1998 versus 1,16 v letech 1998–2000), což je přisuzováno spíše zlepšení výběru dárců a zřejmě i snížení incidence HCV infekce v populaci (26). ČR se řadí mezi státy s vysokým odhadovaným reziduálním rizikem přenosu HCV infekce transfuzí (podle údajů před zavedením screeningového testu HCV RNA v některých zemích) s přihlédnutím k možnému zkreslení výpočtu, uvedenému výše. Kalkulace reziduálního rizika může být ovlivněna i zvolenou průměrnou délkou diagnostického okna, které se může významně lišit podle senzitivity použitého testu.

Reziduální riziko přenosu HCV infekce je způsobeno, kromě diagnostického okna u akutní infekce (43), technickými či lidskými chybami při testování (např. ve Francii bylo odhadnuto riziko přenosu infekce vlivem chybných falešně negativních výsledků testování 0,13 na 1x10^6 odběrů) (26), dalším zdrojem rizika mohou být i chroničtí nosiči HCV, kteří netvoří anti-HCV protilátky (44, 45, 46) nebo infikovaní jedinci s tzv. séroreverzí (vymizení pozitivity anti-HCV v EIA v 6–20 % případů

zlom transfuze 4 14.12.2005 11:55 Stránka 145
proLékaře.cz | 9.12.2026

neléčené HCV infekce u imunokompetentních jedinců) (47, 48). Při hodnocení rizika je však nutné vzít v úvahu i to, že z 1 odběru (jedné odebrané krve/krevní složky) se obvykle vyrobí více transfuzních přípravků, což riziko přenosu HCV infekce transfuzí zvyšuje (u odběru plné krve zhruba 1,3krát – erytrocyty, plazma pro klinické použití event. i trombocyty po odečtení přípravků nevyrobených z různých příčin).

K riziku přenosu HCV infekce je nutno přičíst i reziduální riziko u nových dárců krve. Záchyt HCV infekce je u této skupiny dárců výrazně vyšší než u opakovaných dárců (2,15 ‰ vs. 0,26 ‰ v roce 2004) (25).

Významné zkrácení diagnostického okna přineslo detekování HCV RNA metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) – o 34 až 59 dní (16, 18). Zatímco se v mnoha rozvinutých zemích stala tato metoda součástí screeningových testů dárců (např. USA, Japonsko, Francie, Německo, Rakousko, Nizozemí, Itálie, Polsko, Španělsko) (26, 38, 22, 40, 42, 49, 50–57), objevil se na diagnostické scéně EIA test pro stanovování antigenu HCV (HCVcAg) (Ortho-Clinical Diagnostics). První generace testu detekuje ve vzorcích „volný – cirkulující" HCVcAg, druhá generace testů detekuje navíc HCVcAg vázaný protilátkami. Druhá generace je určena spíše pro konfirmační testování a pro monitorování léčby hepatitidy C (58).

Testování HCVcAg přineslo zkrácení diagnostického okna v průměru o zhruba 6–7 týdnů (59, 60) a značně se tím přiblížilo HCV RNA testům (59, 61, 62, 63, 64, 65). Specificita kolísala u neselektovaných dárců krve od 99,63 do 99,94 % (60, 66, 67).

Některé země zavedly testování HCVcAg do rutinního screeningu dárců krve event. jako alternativu HCV RNA (Polsko, Španělsko) (53, 68, 69). V Polsku se však používá spíše u akutních případů – např. u trombocytových transfuzních přípravků (53). V Itálii jej zkoušejí rutinně využívat po předchozím zavedení screeningového testování HCV RNA (57).

Nedávno (2004) byl vyvinut kombinovaný test (HCV Ag-Ab), který umožňuje současné vyšetření protilátek i antigenu. Kombinovaný test HCV Ag-Ab zkracuje diagnostické okno ve srovnání s klasickými protilátkovými testy o 70 % (70). Hodnocení 35 komerčně dostupných sérokonverzních panelů ukázalo, že kombinovaný test by mohl zkracovat diagnostické okno pro detekci potenciálně infikovaných dárců krve o 17–49 dní proti protilátkovému testu (17–21). V těchto studiích kombinovaný test HCV Ag-Ab zaostával za HCV RNA testy v průměru o cca 2–30 dní (0–131 dní) a zachytával 82–98 % HCV RNA pozitivních anti-HCV negativních vzorků především v závislosti na virové náloži v daném vzorku. Zpoždění záchytu kombinovaným testem záviselo na metodě vyšetření HCV RNA (vyšetření směsi vzorků nebo jednotlivého vzorku) a na zvoleném panelu resp. souboru vyšetřovaných vzorků (delší zpoždění kombinovaného testu bylo pozorováno u HIV pozitivních pacientů). Zkreslení přináší i časový interval mezi jednotlivými vzorky u daného pacienta (u některých panelů i více než 100 dní). Cca 70 % vzorků sérokonverzních panelů je zachytáváno kombinovaným testem a HCV RNA zcela identicky. Senzitivitu kombinovaného testu lze zvýšit rozšířením intervalu „šedé zóny" testu (OD vzorku/OD cut-off = 0,5) (21), což jsme prokázali i v naší studii (soubor 8).

Velmi nedávno (srpen 2005) byla publikována studie srovnávající kombinovaný test a samostatný screeningový test HCVcAg (71). Studie prokázala nižší senzitivitu kombinovaného testu u anti-HCV negativních a HCV RNA pozitivních vzorků (40,8 % vs. 73,8 %). Senzitivita kombinovaného testu se výrazně liší od prací uvedených výše. Průměrné zpoždění kombinovaného testu za HCVcAg testem bylo 16,3 dne. Použití kombinovaného testu u dárců by mohlo podle této studie snížit reziduální riziko přenosu HCV infekce o cca 33–46 %.

Nespornou výhodou kombinovaného testu jsou nižší náklady na testování (oproti protilátkovým testům navýšení pouze o maximálně 16 %) a vyšetření antigenu i protilátky daného vzorku v jedné jamce. Kombinovaný test nepotřebuje změny technologického zázemí v laboratoři včetně stylu laboratorní práce, bez nutnosti přidávat další test (18).

Oproti HCV RNA nevyžaduje testování HCVcAg speciální prostory s přísným režimem, speciální zařízení (pro přípravu směsí, pro PCR metodu), není nutný zásadní trénink personálu, není náchylné na kontaminaci a je výrazně levnější (náklady na prevenci 1 HCV infekce ve Francii při použití HCV RNA byly odhadnuty na 1,2 milionu Euro) (72), také logistika je výrazně jednodušší, protože daný test mohou provádět současné EIA laboratoře. V případě PCR technologie by byla nutná výrazná centralizace vyšetřování spojená s problémy při transportu, předávání výsledků apod. Výhodou testování HCVcAg je rychlejší získání výsledků, individuální screening (nikoliv testování směsí vzorků) (53, 70, 73).

Protilátková senzitivita kombinovaného testu zůstává na úrovni samostatného protilátkového testu (18) s vysokou specificitou (99,85–99,88 %) (18–20). Naše výsledky korespondují s výší specificity, uváděnou v literatuře. Určitou nevýhodou kombinovaného testu oproti protilátkovému testu je delší doba inkubace (o 30 minut), což však v praxi obvykle není zásadním problémem.

Snaha každého výrobce léčiva, mezi které patří i transfuzní přípravky, je produkovat co nejúčinnější, ale i nejbezpečnější výrobek. Ve srovnání s velkou částí Evropy zaostává Česká republika v zavádění dalších virologických testů do činnosti zařízení transfuzní služby. Neprovádí se vyšetření anti-HBc, HCVcAg či HCV RNA. V naší práci poukazujeme na prospěšnost zavedení vyšetření HCVcAg, z finančních a praktických důvodů lépe ve formě kombinovaného testu. Reziduální riziko přenosu HCV infekce se v ČR nedá věrohodně kalkulovat pro nedostatečnou výpovědní hodnotu údajů v celostátním sběru dat o činnosti transfuzní služby. Navíc skutečná výtěžnost zavedení daného testu oproti očekávané podle zkušeností s HCV RNA může být výrazně menší (27, 40). Teprve po případném uplatnění tohoto vyšetřování v rutinní praxi budou k dispozici

zlom transfuze 4 14.12.2005 11:55 Stránka 146
proLékaře.cz | 9.11.2026

i skutečné údaje o reziduálním riziku.

Literatura

1. **Poel van der CL.** Post-transfusion hepatitis. Abstracts book. 3rd Regional ISBT Congress, Prague1991; 17.
2. **Koziol DE, Holland PV, Alling DW, et al.** Antibody to hepatitis B core antigen as a paradoxical marker for non-A, non-B hepatitis agents in donated blood. Ann Int Med 1986; 104: 488–95.
3. **Nelson K, Ahmed F, Ness PM, et al.** Efficacy of donor screening methods on reducing the risk of transfusion transmission of hepatitis C virus (HCV). Poster. Fourth International Symposium on HCV, Tokyo 1993: 40.
4. **Alter HJ.** Posttransfusion hepatitis in the United States. In: Nishioka H, Suzuki H, Mishiro S, Oda T (eds).: Viral hepatitis and liver disease. Proceedings of the International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. Molecules Today, More Cures Tomorrow, Tokyo 1994; 551–553.
5. **Choo QL, Kuo G, Weiner G, et al.** Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science 1989; 244: 359–61.
6. **Barbara J, Müller JY.** The side effects of blood transfusion. In: Transfusion Medicine. A European course on blood transfusion. Centre National d' Enseignement' Distance 1994; 273–311.
7. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, 11th edition. Council of Europe Publishing 2005.
8. Directive 2002/98/EC of the European Parliament and of the Council.
9. **Lauer GM, Walker BD.** Hepatitis C virus infection. N Engl J Med 2001; 345: 41–52.
10. **Williams I.** Epidemiology of hepatitis C in United States. Am J Med 1999; 27: 107: 2S–9S.
11. **Alter MJ.** Epidemiology of hepatitis C. Hepatology 1997; 26(Suppl 1): 62S–65S.
12. **Stránský J.** Virová hepatitida C. Grada Publishing 1999.
13. **Glynn SA, Kleiman SH, Schreiber GB, et al.** Viral incidence and prevalence, 1991–1998 (abstract). The NHLBI Retrovirus Epidemiology Donor Study (REDS). Transfus Clin Biol 2001; 8(Suppl. 1): 37.
14. **Niederhauser C, Schneider P, Fopp M, Ruefer A, Lévy G.** Incidence of viral markers and evaluation of the estimated risk in the Swiss blood donor population from 1996 to 2003. Euroserveillance 2005; 10: 7–8.
15. **Soldan K, Barbara JAJ, Ramsay ME, Hall AJ.** Estimation of the risk of hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus infectious donations entering the blood supply in England, 1993–2001. Vox Sang 2003; 84: 274–286.
16. **Schreiber GB, Busch MP, Kleinmann SH, Koreliz JJ,** for the Retrovirus Epidemiology Donor Study. The risk of transfusion-transmitted viral infections. N Engl J Med 1996; 334: 1685–90.
17. **Lambert N, Prigent V, Costaille M, et al.** Monolisa HCV Ultra test evaluation on Bio-Rad Evolis automated microplate processor. XVth ISBT European Regional Conference, Athens 2005; P203.
18. **Ansaldi F, Bruzzone B, Testino G, et al.** Combination hepatitis C virus antigen and antibody immunoassay as a new tool for early diagnosis if infection. XVth ISBT European Regional Conference, Athens 2005; P181.
19. **Laperche S, Elghouzzi MH, Asso-Bonnet M, et al.** Combined detection of hepatitis C virus core antigen and antibody as an alternative to nucleic acid testing in blood screening. XVth ISBT European Regional Conference, Athens 2005; M-PA-039.
20. **Flecheux O, Charpantier C, Lambert N, et al.** Improvement of the sensitivity for three blood screening tests of the new Bio-Rad ultra line: Ag HBs, HIV and HCV. 21st NRL Workshop on serology, Melbourne 2004; Abstract.
21. **Schnuriger A, Dominguez S, Valantin M-A, et al.** Early detection of hepatitis C seroconversion using a new combined antigen-antibody detection assay: potential use in high risk individuals. 8th Annual meeting of the ESCV, Geneva, 2005.
22. **Offergeld R, Faensen D, Ritter S, Hamouda O.** Human immunodeficiency virus, hepatitis C and hepatitis B infections among blood donors in Germany 2000–2002: risk of virus transmission and the impact of nucleic acid amplification testing. Euroserveillance 2005; 10: 13–14.
23. **Alvarez M, Oyonarte S, Rodriguez PM, Hernandez JM.** Estimated risk of transfusion-transmitted viral infections in Spain. Transfusion 2002; 42: 994–98.
24. **Tosti ME, Solinas S, Prati D, et al.** An estimate of the current risk of transmitting blood-borne infections through blood transfusion in Italy. Br J Haematol 2002; 117: 215–9.
25. **Turek P.** Produkce transfuzní služby v ČR v roce 2004. Trans Hemat dnes 2005; v tisku.
26. **Pillonel J, Laperche S, Saura C, et al.** Trends in residual risk of transfusion–transmitted viral infections in France between 1992 and 2000. Transfusion 2002; 42(8): 980–988.
27. **Koerner K, Cardodo M, Dengler TH, Kerowgan M, Kubanek B.** Estimated risk of transmission of hepatitis C virus by blood transfusion. Vox Sang 1998; 74: 213–216.
28. **Velati C, Romanè L, Baruffi L, Pappalettera M, Carreri V, Zanetti AR.** Residual risk of transfusion-transmitted HCV and HIV infections by antibody-screened blood in Italy. Transfusion 2002; 42: 989–93.
29. Roční výkaz o činnosti ZZ (transfuzní služba), statistický formulář MZ ČR A(MZ) 1–01.
30. **Kleinman S, Busch M, Holland P.** Post-transfusion hepatitis C virus infection (letter). N Engl J Med 1992; 327: 1601–2.
31. **Polesky HF, Hanson M.** Anti-HCV proficiency testing. Abstracts book. 23rd ISBT Congress, Amsterdam 1994; 96.
32. **Abdel-Hamid M, El-Daly M, El-Kafrawy S, Mikhail N, Strickland GT, Fix AD.** Comparison of second- and third-generation enzyme immunoassays for detecting antibodies to hepatitis C virus. J Clin Microbiol 2002; 40(5): 1656–9.
33. **Barrera JM, Francis B, Ercilla G, et al.** Improved detection of anti-HCV in post-transfusion hepatitis by a third generation ELISA. Vox Sang 1995; 68: 15–18.
34. **Busch MP, Korelitz JJ, Kleinman SH, et al.** Declining value of alanine aminotransferase in screening of blood donors to prevent posttransfusion hepatitis B and C virus infection. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. Transfusion 1995; 35: 903–910.
35. **Couroucé AM, Pillonel J.** [Estimation of risk of virus transmission in hepatitis B and C and human retrovirus via transfusion of labile blood derivatives]. Transfus Clin Biol 1996; 3: 3–18.
36. **Pillonel J, Saura C, Couroucé AM.** Screening of viral markers for HIV, HBV and HCV infections in France and residual risk of viral transmission by blood transfusion. Eurosurveillance 1998; 3: 76–9.
37. **Müller-Breitkreutz K.** Results of viral marker screening of unpaid donations and probability of window period donations in 1997. EPFA Working Group on Quality Assurance. Vox Sang 2000; 78: 149–157.
38. **Dengler T., Richter E.** Ten years experience with anti-HCV screening of blood donors. 26th ISBT Congress, Vienna 2000; P361.
39. **Roth W, Buhr S, Drosten Ch, Seifried E.** NAT and viral safety in blood transfusion. Vox Sang 2000; 75(suppl 2): 257–259.
40. **Seed CR, Cheng A, Ismay SL, et al.** Assessing the accuracy of three viral risk models in predicting the outcome of implementing HIV & HCV NAT donor screening in Australia and the implications for future HBV NAT. Transfusion 2002; 42: 1365–1372.
41. **Snape T, Flanagan P.** Intoduction of nucleic acid amplification testing of plasma pools – implications for an integrated blood service. Infusionsther Transfusionsmed 1998; 94–97.
42. **Tegtmeier GE, Henderson SE, Blosser JK.** Nucleic acid amplification testing (NAT) of United States Midwestern blood donors for HCV RNA. 26th ISBT Congress, Vienna 2000; P448.
43. **Busch MP, Stramer SL, Kleinman SH.** Evolving applications of nucleic acid amplification assays for prevention of virus transmission by blood components and derivatives. In: Garatty G. Application of molecular biology to blood transfusion medicine. Bethesda, AABB 1997; 123–177.

zlom transfuze 4 14.12.2005 11:55 Stránka 147
proLékaře.cz | 9.11.2026

44. **Rapicetta M, Dettori S, Kondili LA, et al.** Persistence of HCV-RNA in a blood donor with negative antibody assay. Vox Sang 1999; 76: 192–193.
45. **Durand F, Beauplet A, Marcellin P.** Evidence of hepatitis C virus without detectable antibody to hepatitis C virus in a blood donor. Ann Intern Med 2000; 133: 74–5.
46. **Peoples BG, Preston SB, Tzeng JL, et al.** Prolonged antibody-negative HCV viremia in a US blood donor with apparent HCV transmission to a recipient. Transfusion 2000; 40: 1280–1.
47. **Kondili LA, Chionne P, Costantino A, et al.** Infection rate and spontaneous seroreversion of anti-hepatitis C virus during the natural course of hepatitis C virus infection in the general population. Gut 2002; 50: 693–6.
48. **Lefrère JJ, Girot R, Lefrère F, et al.** Complete or partial seroreversion in immunocomponent individuals after self-limited HCV infection: consequences for transfusion. Transfusion 2004; 44: 343–348.
49. **Germain M, Poulin L, Decary F.** A stepwise strategy for implementing universal screening of blood donors for HCV by nuclear acid testing (NAT). 26th ISBT Congress, Vienna 2000; P445.
50. **Sher GD, Scalia V, Zuber ED, Chapman PWD.** Nucleic acid amplification testing (NAT) for hepatitis C (HCV) in Canada. 26th ISBT Congress, Vienna 2000; P458.
51. **Roth WK, Weber M, Buhr S, et al.** Yield of HCV and HIV-1 NAT after screening of 3,6 million blood donations in Central Europe. Transfusion 2002; 42: 862–868.
52. **Murokawa H, Yoshikawa A, Ohnuma H, et al.** Epidemiology of blood donors in Japan, positive for hepatitis B virus and hepatitis C virus by nucleic acid amplification testing. Vox Sang 2005; 88: 10–116.
53. **Letowska M, Brojer E, Mikulska M, Gronowska A, Rosiek A.** Hepatitis C core antigen in Polish blood donors. Transfusion 2004; 44: 1067–1071
54. **Orton SL, Stramer SL, Dodd DY, Alter MJ.** Risk factors for HCV infection among blood donors confirmed to be positive for the presence of HCV RNA and not reactive for the presence of anti-HCV. Transfusion 2004; 44: 275–281.
55. **Brojer E, Letowska M, Gronowska A.** Nucleic acid testing for virus screening in Polish blood donors. Transfus Med 2004; 14: 78–9.
56. **Velati C, Baruffi L, Romanė L, Fomiatti L, Carreri V, Zanetti A.** Introduction of NAT method of screening blood donors in Italy: reports of the two years of experience and revaluation of residual risk. Blood Transf 2003; 4: 368–78.
57. **Velati C, Baruffi L, Romanė L, et al.** NAT screening on blood donations in Italy: results of two years of experience. Vox Sang 2004; 87(Suppl. 3): 101.
58. **Dow BC, Munro H, Buchanan I, et al.** Acute hepatitis C virus seroconversion in a Scottish blood donor: HCV antigen is not comparable with HCV nucleic acid amplification technology screening. Vox Sang 2004; 86: 15–20.
59. **Couroucé AM, Le Marrec N, Bouchardeau F, et al.** Efficacy of HCV core antigen detection during the preseroconversion period. Transfusion 2000; 40: 1198–1202.
60. **Calmann M, Raritan NJ.** A multi-center evaluation of a novel assay for the direct detection of hepatitis C core antigen. 26th ISBT Congress, Vienna 2000; P492.
61. **Peterson J, Green G, Iida K, et al.** Detection of hepatitis C core antigen in the antibody negative „window“ phase of hepatitis C infection. Vox Sang 2000; 78: 80–85.
62. **Tanaka E, Ohue C, Aoyagi K, et al.** Evaluation of a new enzyme immunoassay for hepatitis C virus (HCV) core antigen with clinical sensitivity approximating that of genomic amplification of HCV RNA. Hepatology 2000; 32: 388–93.
63. **Icardi G, Ansaldi F, Bruzzone BM, et al.** Novel approach to reduce the hepatitis C virus (HCV) window period: clinical evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay for HCV core antigen. J Clin Microbiol 2001; 39: 3110–3114.
64. **Lee SR, Peterson J, Niven P, et al.** Efficacy of a hepatitis C virus core antigen enzyme-linked immunosorbent assay for identification of „window-phase“ blood donations. Vox Sang 2001; 80: 19–23.
65. **Nübling CM, Unger G, Chudy M, Raia S, Lüwer J.** Sensitivity of HCV core antigen and HCV RNA detection in the early infection phase. Transfusion 2002; 42: 1037–1045.
66. **Bouchardeau F, Maniez M, Le Marrec N, et al.** HCV core antigen detection: efficacy in the early phase of HCV infection and specificity in blood donor screening. 26th ISBT Congress, Vienna 2000; P472.
67. **Cano H, Candela MJ, Lozano ML, Vicente V.** Application of a new enzyme-linked immunosorbent assay for detection of total hepatitis C virus core antigen in blood donors. Transf Med 2003; 13–259–266.
68. **Sanz C, Tassies D, Costa J, Freire C, Pereira A.** The first case of HCV infection detected before seroconversion in blood donors tested by HCV core antigen ELISA. Transfusion 2002; 42: 505–6.
69. **Brojer E, Gronowska A, Medynska J, et al.** The hepatitis C virus genotype and subtype frequency in hepatitis C virus RNA-positive, hepatitis C virus antibody-negative blood donors identified in the nucleic acid test screening program in Poland. Transfusion 2004; 44(12): 1706–10.
70. **Duong LT.** The place of Ag-Ab combined assay in blood banks. National Scientific Workshop on Clinical Use of Blood (NIHBT), Hanoi 2004; Abstract.
71. **Laperche S, Le Marrec N, Girault A, et al.** Simultaneous detection of hepatitis C virus (HCV) core antigen and anti-HCV antibodies improves the early detection of HCV infection. J Clin Microbiol 2005; 43: 3877–3883.
72. **Saura C, Couroucé AM, Pillonel J, et al.** Risk-benefit analysis on nucleic acid testing; the French experience. Biologicals 1999; 27: 343–8.
73. **Simmonds P, Kurtz J, Tedder R.** The UK blood transfusion service: over a (patent) barrel. Lancet 2002; 359: 1713–1714.

MUDr. J. Masopust
Transfuzní oddělení MN v Ústí nad Labem
Sociální péče 3316/12A
40113 Ústí nad Labem
e-mail: jiri.masopust@mnul.cz

Poděkování: Autoři děkují za provedení laboratorního vyšetření a zpracování dat kolegyním ing. Hrdinové, V. Kavříkové, Mgr. R. Kofránkové, RNDr. D. Kuťkové, Z. Murínové a K. Nedělkové.

Došlo do redakce: 11. 10. 2005