

# Izplen presejalnega testiranja krvodajalcev s tehniko NAT v Sloveniji

Yield of NAT screening in Slovenia

Snežna Levičnik Stezinar, Polonca Nograšek

Zavod RS za transfuzijsko medicino, Štajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

## Korespondenca/ Correspondence:

Snežna Levičnik Stezinar, dr. med., spec. transf. med., Zavod RS za transfuzijsko medicino, Štajmerjeva 6, 1000 Ljubljana, tel.: 01-5438-150, snezna.levicnik@ztm.si

## Ključne besede:

presejalno testiranje, diagnostično okno, NAT, označevalci okužb, okultna okužba s hepatitisom B, OBI

## Key words:

blood donor screening, window period, nucleic acid, viral marker, OBI – occult hepatitis B infection

## Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2012; 81 supl 2: II-257–64

Prispelo: 7. mar. 2012,  
Sprejeto: 25. sept. 2012

## Izvleček:

**Izhodišče:** Cilj preskrbe s krvjo je zagotoviti varno kri za transfuzijo. Presejalno testiranje odvzetih enot krvi za transfuzijo z metodami za neposredno ugotavljanje prisotnosti virusov je eden od ukrepov za doseganje še večje varnosti preskrbe s krvjo. S tehnologijo NAT (*angl.* Nucleic Acid Amplification Technology; metode pomnoževanja nukleinskih kislin) uspemo zaznati okužbo v obdobju diagnostičnega okna pred pojavom seroloških označevalcev okužb.

**Metode in rezultati:** Z metodami NAT neposredno dokazujemo prisotnost nukleinskih kislin virusov (RNA, DNA) v različnih bioloških vzorcih. V Sloveniji smo presejalno testiranje vseh odvzetih enot krvi na RNA virusa hepatitisa C (HCV) z metodo PCR (*angl.* Polymerase Chain Reaction; verižna reakcija s polimerazo) uvedli leta 2000. Testiranje smo izvajali v zlivkih. Do leta 2007 smo pretestirali 590.000 enot krvi in nismo odkrili nobene donacije s samo HCV RNA pozitivnim rezultatom. V letu 2007 smo testiranje razširili na zaznavanje treh virusov: HCV, virusa hepatitisa B (HBV) in človeškega virusa imunske pomanjkljivosti (HIV) ter ga izvajali po metodi TMA (*angl.* Transcription Mediated Amplification; pomnoževanje, posredovano s prepisovanjem RNA) na posameznih enotah. V petletnem obdobju smo pretestirali 458.000 enot in ugotovili 2 donaciji s prisotno samo HCV RNA (pogostost je 1:524.000 za celotno dvanajstletno obdobje). Oba odvzema sta bila opravljena v obdobju diagnostičnega okna.

V 29 odvzetih enotah smo zaznali prisotnost samo HBV DNA. V vseh primerih je šlo za prebolevnika po okužbi s HBV, v enem primeru za nedavno okužbo, v 28 pa za kronično obliko skritega, okultnega hepatitisa B (OBI). Izplen testiranja z NAT za HBV je 1:15.600 testiranih enot krvi. Odkrili nismo nobene odvzete enote krvi, v kateri bi bila prisotna samo HIV 1 RNA. V

vseh 5 enotah, ki so bile NAT pozitivne na HIV, smo zaznali tudi specifična protitelesa anti-HIV. Izplen za HIV je 0:460.000.

**Zaključek:** Uvedba presejalnega testa z NAT za tri viruse je povečala varnost preskrbe s krvjo. V petih letih smo na ta način iz uporabe izločili 31 kužnih enot krvi, ki so bile samo NAT-pozitivne.

## Abstract

**Background:** Safe blood supply is the main goal of blood transfusion services. Nucleic Acid Amplification Technologies (NAT) are the methods for direct detection of viral genomes in various biological samples. Introduction of NAT blood screening reduces the risk for transfusion transmitted diseases and improves the safety.

**Methods and Results:** In Slovenia NAT screening with PCR (Polymerase Chain Reaction) method for testing pools of samples for hepatitis C virus (HCV) RNA was implemented in 2000. The screening is mandatory for all donations. Until 2007, 590,000 donated units had been screened and there were no HCV RNA-only positive result.

In 2007, the testing was expanded to three viruses: HCV, hepatitis B virus (HBV) and human immunodeficiency virus (HIV). The testing method was TMA (Transcription Mediated Amplification) performed on individual donations. In five-year period, 458,000 blood units were screened and two window-period donations positive for HCV were detected (yield 1:524,000). HBV DNA-only was detected in 29 units. All the cases were donors with a resolved HBV infection, in one case the recent one, in others the occult hepatitis B infection (OBI) was confirmed. The yield of NAT testing for HBV is 1:15,600 units. There were no donations with HIV 1 RNA-only result. In all 5 HIV positive units in this period, anti-HIV antibodies were present as well. The

yield of HIV NAT-only is thus 0:460,000.

**Conclusion:** The implementation of NAT screening for three viruses has improved the

blood safety. In the five-year period, 31 infectious units that were NAT-only positive were eliminated from the stock.

## Uvod

Cilj preskrbe s krvjo je zagotoviti varno kri za transfuzijo. Bolniki, prejemniki krvi in zdravil iz krvi, ter javnost pričakujejo oskrbo z varnimi krvnimi pripravki, ki niso vir morebitne okužbe.<sup>1-2</sup>

Zato ne le stroka, pač pa tudi široka javnost podpirajo prizadevanja, raziskave in uvajanje ukrepov za zmanjševanje še preostalega tveganja. V zadnjih dveh desetletjih so bili v presejalnem testiranju krvodajalcev uvedeni številni ciljani ukrepi za izboljšavo procesov testiranja, tako nespecifični, kot so izboljšave postopkov testiranja in reagentov, avtomatizacija, procesne kontrole kot tudi specifični ukrepi. Med specifičnimi ukrepi se je najbolj uveljavilo dodatno presejalno testiranje za neposredno določanje s krvjo prenosljivih virusov z metodami za določanje virusnih nukleinskih kislin (NK).<sup>3-7</sup>

Z metodami NAT (*angl.* Nucleic Acid Amplification Technology; metode pomnoževanja nukleinskih kislin) dokazujemo NK virusov (RNA, DNA) v različnih bioloških vzorcih. Princip metod NAT je pomnoževanje in zaznavanje majhnih količin genskega materiala. Tarčno zaporedje od 10 do 100 baznih parov v vijačnici DNA ali RNA se s pomočjo encimov, ki sodelujejo v biokemičnih reakcijah, tolikokrat pomnoži (več 100 tisočkrat do več milijonkrat), da jih uspemo zaznati z različnimi detekcijskimi metodami, na primer z biokemijskimi reakcijami. Tarčni odseki so visoko specifični. Izberemo tiste dele NK, ki so specifični za posamezni organizem in se ne pojavljajo v genomih drugih organizmov.

V transfuzijski medicini se uporabljata metodi PCR (*angl.* Polymerase Chain Reaction; verižna reakcija s polimerazo) in TMA (Transcription Mediated Amplification; pomnoževanje, posredovano s prepisovanjem RNA).<sup>8</sup>

Z NAT dokazujemo povzročitelja v obdobju seronegativnega okna, omogoča pa

tudi zaznavanje izjemno nizkih vsebnosti povzročitelja, ki jih z drugimi metodami za neposredno zaznavanje zaradi njihove omejene občutljivosti ne uspemo ugotoviti.

Diagnostično okno je čas od okužbe do zmožnosti zaznave okužbe z laboratorijskimi diagnostičnimi metodami. Trajanje diagnostičnega okna je odvisno od povzročitelja okužbe, gostitelja, vrste označevalca okužbe in diagnostične metode.

Na podlagi občutljivostnih testiranj in primerjalnih analiz različnih pristopov k testiranju (posamezne donacije ali zlivki; primerjava različnih metod in testnih sistemov, ki se uporabljajo za testiranje krvodajalcev) z metodo NAT in z uporabo matematičnih modelov je bilo ocenjeno tveganje za prenos okužbe s transfundirano krvjo v predserokonverzijskem obdobju. Analize teh podatkov so izhodišče za matematično oceno še preostalega diagnostičnega okna, kadar se izvaja presejanje krvodajalcev z NAT.<sup>9-11</sup>

Pri okužbi s človeškim virusom imunske pomanjkljivosti (HIV) s presejalnim testom 3. generacije iščemo protitelesa anti-HIV, ki so odraz imunskega odziva organizma na okužbo in jih zaznamo 3 tedne po okužbi. S testi 4. generacije (zaznavajo protitelesa anti-HIV in virusno beljakovino p24) uspemo ugotoviti okužbo že po dveh tednih. Metoda NAT s testiranjem posameznih enot krvi z drugo generacijo reagentov pa omogoča, da neposredno zaznamo virus (oz. specifično tarčno zaporedje NK) že približno pet dni po okužbi. Diagnostično okno je tako krajše po oceni za 10 dni. Pri okužbi z virusom hepatitisa C (HCV) je diagnostično okno krajše za do 60 dni, virus pa zaznamo že 3.–5. dan po okužbi.<sup>9-11</sup> Pri okužbi z virusom hepatitisa B (HBV) uspemo HBV DNA zaznati že po 15 dneh, HBsAg pa ne prej kot 36. dan. Diagnostično okno je torej zoženo za 20 dni.<sup>9-11</sup>

Metode za dokazovanje NK so izjemno občutljive in imajo močan potencial, da omogočajo zaznavanje okužb v obdobju niz-

kega virusnega bremena. Še zlasti je to aktualno pri okužbi s HBV, ko HBsAg že izgine iz obtoka, virus pa je le v sledih prisoten v jetrnih celicah oz. krvnem obtoku. Govorimo o skritem ali tihem ali okultnem hepatitisu B (OBI – Occult B hepatitis Infection). Pri OBI antigena HBs ne zaznamo, prisotna pa je virusna DNA v nizki koncentraciji v sočasni prisotnosti protiteles anti-HBc in s prisotnimi ali odsotnimi drugimi protitelesi.<sup>12-14</sup>

Tehnologijo NAT odlikuje tudi izredno visoka specifičnost. Zaznavanje NK je usmerjeno na tisti del genoma, ki je enkraten, specifičen samo za iskani virus. Lažno pozitivnih rezultatov tako ni, lahko pa pridobimo napačno pozitiven rezultat v primeru kontaminacije vzorca.

V devetdesetih letih prejšnjega stoletja se je v diagnostiki začelo uvajati NAT za zgodnejše in bolj zanesljivo odkrivanje okužb. Tehnološki razvoj je kmalu omogočil tudi rutinsko izvajanje testiranja na velikem številu vzorcev, kar je omogočilo uvedbo te metodologije v presejalno testiranje krvodajalcev.<sup>3-8</sup> V Sloveniji se ugotavljanje HCV RNA v zlivkih izvaja tudi v diagnostičnem testiranju bolnikov.<sup>15,16</sup>

Ob spoznanjih, da je bila kljub presejalnemu testiranju izvorna plazma za predelavo v zdravila okužena s HCV, je farmacevtska

industrija v poznih devetdesetih letih prejšnjega stoletja uvedla testiranje proizvodnih zlitij plazme, odvzete več tisočim krvodajalcem, na vsebnost HCV RNA.<sup>17</sup>

Da pa ne bi bile izgube te izjemno dragocene surovine zaradi morebitne okužbe s HCV prevelike, so začeli predhodno testiranje manjših zlivkov (npr. 96) (*angl.* pool-ov) že pred zlivanjem plazme (pooliranjem) v produkcijski zlivek. Sčasoma se je to testiranje preneslo na izvorno mesto zbiranja plazme, to je transfuzijske ustanove in izvajalo v realnem času, to je neposredno po odvzemu in pred sprostitvijo odvzetih enot, tudi celičnih, za uporabo.

V Sloveniji smo med prvimi državami uvedli postopek za odkrivanje HCV julija 1999 za zbrano plazmo, marca 2000 pa za vse odvzete enote krvi. Do uvedbe testiranja vsake posamezne donacije s trojnim testom v letu 2007 smo pretestirali skoraj 600.000 enot.<sup>18</sup>

Hiter tehnološki razvoj diagnostičnih metod NAT je omogočil hitrejšo in enostavnejšo izvedbo testiranja, popolno avtomatizacijo postopkov in predvsem sočasno zaznavanje več vrst virusov v eni sami reakciji v isti reakcijski epruveti. Tako smo v letu 2007 uvedli nov način presejalnega testiranja. S sodobno testno metodo testiramo vsako posamezno donacijo sočasno na tri

**Tabela 1:** Pogostost zaznavanja virusnih NK z NAT metodo v doniranih enotah krvi.

Št. testiranih enot krvi dajalcev 2007–2011	Virus		Št. odkritih okužb					Skupaj
			2007	2008	2009	2010	2011	
458089	HBV	DO	0	0	0	0	0	0
		OBI	6	7	1	7	8	29
		HBsAg POZ	12	10	11	11	9	53
467729 (458089+9640)**	HCV	DO	1	1	0	0	0	2
		anti-HCV POZ*	9	4	2	1	0	16
458089	HIV	DO	0	0	0	0	0	0
		HIV Ag/Ab POZ	1	0	0	2	2	5
DO – diagnostično okno							Skupaj:	105

– samo NAT pozitivni      OBI – okultni hepatitis B

\*V obdobju testiranja zlivkov (2000–2006) smo v 33 od 50 anti-HCV pozitivnih vzorcev (66 %) zaznali tudi HCV RNA.

\*\*Seštevek enot, testiranih s trojnim testom NAT od l. 2007 dalje in enot, testiranih še na HCV RNA v zlivkih v začetku l. 2007, pred prehodom na trojni test NAT.

viruse: HBV, HCV in HIV. V primeru pozitivnega izsledka je potrebno le razrešitveno testiranje za ugotavljanje vrste iskanega virusa.<sup>19</sup>

## Metode

### Testiranje na HCV RNA z metodo PCR v zlivkih

Leta 1999 smo pričeli z retrogradnim testiranjem vse zbrane plazme za predelavo v zdravila iz krvi v zlivkih zbrane plazme iz 90–110 alikvotov na HCV RNA. S 1. marcem 2000 smo uvedli obvezno testiranje vsake odvzete enote krvi. Iz vzorca krvi vsakega krvodajalca smo odvzeli alikvot 200 µl plazme in združili 48 vzorcev plazme v zlivke in testirali na HCV RNA z metodo PCR. V primeru pozitivnega rezultata je bilo potrebno razrešitveno testiranje v dveh zaporednih korakih, da smo lahko identificirali pozitivno enoto in jo izločili, preostale negativne pa sprostili za uporabo.

Testiranje smo izvajali na avtomatiziranem sistemu Cobas Amplicor (Roche Diagnostics, Branchburg, ZDA). V prvem obdobju smo osamitev NK izvajali po ročnem postopku, leta 2002 smo prešli na avtomatizirani postopek na napravi Cobas Ampliprep (Roche Diagnostics, Branchburg, ZDA).

Testiranje smo izvajali z metodo PCR z reagenti Cobas Amplicor v zlivkih po 48, kasneje (leta 2002) z reagenti Cobas Ampliscreen (Roche Diagnostics, Branchburg, ZDA) v zlivkih plazme, pridobljenih iz 24 vzorcev krvi krvodajalcev.

Vzorci za testiranje so odvzeti na vseh dnevniških odvzemnih mestih v državi in prepeljani v Laboratorij za NAT presejal-

no testiranje na Zavodu RS za transfuzijsko medicino (ZTM). Testiranje izvajamo v popoldanskem in večernem času. Zjutraj pridobljene rezultate vpišemo v podatkovno bazo odvzetih enot krvi. Ti podatki se po elektronski poti prenesejo na vsa odvzemna mesta v državi.<sup>18-19</sup> Proces zbiranja vzorcev krvi na področju celotne države, testiranja in upravljanja s podatki in rezultati se vodi z računalniškim programom Info-PCR, razvitim na ZTM za potrebe presejalnega testiranja z metodo NAT za celotno državo.

### Testiranje na HIV 1 RNA, HCV RNA in HBV DNA z metodo TMA v posameznih vzorcih krvi

V letu 2007 smo testiranje razširili na zaznavanje treh virusov, poleg HCV, še na HBV in HIV 1. Testiramo posamezne vzorce krvi krvodajalcev in ne več zlivkov.

Uporabljena metoda je TMA. Testiranje izvajamo na popolnoma avtomatiziranem testirnem sistemu Procleix Tigris z reagenti Procleix Ultrio Plus (Novartis/Gen-Probe Inc., San Diego, ZDA).

V primeru pozitivnega rezultata je potrebno razrešitveno testiranje za prepoznavanje virusa, katerega virusno NK smo v reakciji zaznali.

## Rezultati

V prvem obdobju testiranja z metodo PCR na HCV RNA v zlivkih smo pretestirali 591.166 odvzetih enot krvi. HCV RNA smo zaznali v 33 testiranih enotah. V vseh so bila prisotna tudi protitelesa anti-HCV. Nismo pa HCV virusne NK zaznali v preostalih anti-HCV pozitivnih enotah. Razmerje anti-HCV pozitiven / HCV RNA pozitiven proti

**Tabela 2:** Pogostost zaznavanja samo NAT-pozitivnih v obdobju 2007–2011.

Virus	Označevalec	Št. odkritih krvodajalcev	Pogostost na 100.000 odvzetih enot	Prevalenca pojavnosti med odvzetimi enotami
Hepatitis B	HBV DNA	29	6,3/10 <sup>5</sup>	1/15.796
Hepatitis C	HCV RNA (pool)	0	/	/
	HCV RNA (ID)	2	0,43/10 <sup>5</sup>	1/229.044
	HCV RNA (pool+ID)	2	0,19/10 <sup>5</sup>	1/524.627
HIV	HIV RNA	0	/	/

anti-HCV pozitiven / HCV RNA negativen je 2 : 1.

V nobeni enoti pa nismo zaznali samo HCV RNA v odsotnosti drugih označevalcev okužb, kar potrjuje, da noben odvzem krvi krvodajalcev ni bil opravljen v obdobju diagnostičnega okna. Izplen testiranja za samo HCV RNA pozitivne enote je bil 0 : 591.166 enot.

Po prehodu na presejalno testiranje NAT po metodi TMA na tri viruse in izvedbo testiranja na posameznih donacijah smo do konca leta 2011 pretestirali 458.089 odvzetih enot krvi. V 105 primerih smo dokazali vsebnost virusnih NK. V 31 primerih je bila zaznana samo virusna NK brez drugih specifičnih virusnih označevalcev. V preostalih 74 vzorcih pa so bili prisotni tudi drugi označevalci, značilni za okužbo z ugotovljenim virusom. V Tabeli 1 prikazujemo obseg presejanja krvodajalcev z metodami NAT in izplen zaznanih okužb z virusi HBV, HCV in HIV med krvodajalci.

V dveh primerih smo ugotovili prisotnost virusa v obdobju diagnostičnega okna. Obakrat smo zaznali HCV. V prvem primeru smo serokonverzijo, to je pojav specifičnih anti-HCV protiteles, zaznali sedem dni kasneje. V drugem primeru je bil kontrolni vzorec odvzet štirinajst dni po donaciji krvi in zabeležili smo serokonverzijo. V dvanajstletnem obdobju presejanja na anti-HCV

smo tako v 1.049.255 testiranih enotah dvakrat odkrili »samo-HCV RNA« pozitivno enoto krvi. Izplen za HCV, odkrit v diagnostičnem oknu v celotnem obdobju testiranja je torej 1:524.627 (Tabela 2).

Odkrili nismo nobene donacije, pri kateri bi bila prisotna samo-HIV 1 RNA. V vseh petih donacijah s pozitivnim rezultatom testiranja NAT na HIV, so bila v vzorcu dokazana tudi protitelesa anti-HIV (Tabela 2).

Celokupni izplen testiranja na DNA HBV je veliko večji. V 53 od 58 vzorcev, pri katerih smo v presejalnem testiranju zaznali HBsAg, smo dokazali tudi HBV DNA. Za 5 enot, ki so bile HBsAg poz/ HBV DNA neg, se je kasneje izkazalo, da gre za zaznavo HBsAg po nedavnem cepljenju proti HBV. Dodatno pa smo samo HBV DNA zaznali še v 29 primerih, to je s pogostostjo 6 primerov letno (Tabela 2).

Vseh 29 odvzemov s pridobljenim pozitivnim rezultatom samo HBV DNA je bilo odvzetih rednim, večkratnim krvodajalcem. Ti so kri že darovali od enkrat do enaindesetkrat, v povprečju vsak krvodajalec dvaindvajsetkrat, preden smo v donaciji zaznali HBV DNA. V Tabeli 3 prikazujemo povzetek rezultatov testiranja samo HBV DNA pozitivnih krvodajalcev na označevalce okužbe s HBV.

Po pridobljenih podatkih dodatnega testiranja 28 od teh vzorcev na vsebnost dru-

**Tabela 3:** Prisotnost označevalcev okužbe s HBV med krvodajalci z OBI.

Presejalno testiranje		Dodatno testiranje					ŠTEVILO (DELEŽ)
HBsAg	HBV DNA	anti-HBc	IgM anti-HBc	HBeAg	anti-HBe	anti-HBs	
-	+	+	-	-	-	-	15 (51,80 %)
-	+	+	-	+	-	-	0 (0)
-	+	+	-	-	+	-	3 (10,30 %)
-	+	+	-	-	-	+	7 (24,10 %)
-	+	+	-	-	+	+	3 (10,30 %)
-	+	+	+	-	+	-	1 (3,50 %)
Skupaj:							29 (100,00 %)

gih označevalcev okužbe s HBV, se je izkazalo, da gre v vseh teh primerih za OBI. V vseh vzorcih smo ugotovili protitelesa anti-HBc v prisotnosti ali odsotnosti drugih protiteles (Tabela 3).

V enem primeru smo poleg protiteles anti-HBc zaznali še IgM anti-HBc in anti-HBe. V postopku retrogradnega pregleda odvzema deset mesecev pred tem, nismo ugotovili nobenih označevalcev za okužbo s HBV. Pri testiranju kontrolnega vzorca 25 dni po izvornem testiranju smo pridobili enake rezultate kot v izvornem vzorcu. Virusno breme je bilo v izvornem vzorcu visoko. Na podlagi pridobljenih anamnestičnih podatkov in rezultatov testiranja smo zaključili, da je bil odvzem opravljen v fazi drugega diagnostičnega okna, ko HBsAg ni več zaznaven, protiteles anti-HBs pa tudi še ni.<sup>20</sup> Če ne bi izvajali presejalnega testiranja na HBV DNA, bi zanesljivo tvegali prenos okužbe s krvnimi pripravki z visokim virusnim bremenom.

Ob analizi rezultatov presejalnega testiranja smo ugotovili, da so bila v vseh vzorcih z rezultatom samo HBV DNA pozitiven, prisotna protitelesa anti-HBc (100 %). V 15 vzorcih (51,8 %) so bila prisotna izključno le protitelesa anti-HBc. V 10 vzorcih smo sočasno zaznali tako anti-HBc kot anti-HBs (34 %) (Tabela 3). V šestih primerih je bila koncentracija protiteles anti-HBs nižja od 50 IE/l, v štirih pa višja od 50 IE/l. Najvišja izmerjena vrednost je bila 103 IE/l.

## Razpravljanje

Da bi se čimbolj približali ničelnemu tveganju za prenos okužb s krvjo, smo bili v Republiki Sloveniji med prvimi državami, ki so uvedle obvezno presejalno testiranje za neposredno dokazovanje HCV v vseh odvzetih enotah krvi.<sup>8</sup> Odločitev za testiranje tudi na HIV 1 RNA je bila v primerjavi z drugimi državami sprejeta kasneje, saj je verjetnost odkriti samo HIV 1 RNA pozitivne enote majhna zaradi nizke prevalence okužb s HIV tako med slovenskimi krvodajalci kot tudi v populaciji prebivalcev Slovenije. Incidenca odkritih okužb s HIV med krvodajalci je v celotnem obdobju testiranja konstantna (od 0 do 3 primeri letno). Čeprav

incidenca okužb s HIV med prebivalstvom v Sloveniji v zadnjem desetletju narašča, se Slovenija z manj kot 1 s HIV okuženo osebo na 1000 prebivalcev, še vedno uvršča med države z nizkim deležem okužb v primerjavi z večino držav Evropske unije.<sup>21</sup> Z dostopnostjo enostavnih, hitrih, zmogljivejših ter cenovno sprejemljivih testnih metod je postala aktualna razširitev testiranja na več virusov, še posebej na HBV, saj je vedno več poročil o prenosu okužb s HBV s transfuzijo, ko HBsAg ni bil zaznan in so bili krvodajalci kronični nosilci virusa.<sup>12-14</sup>

Izplen presejalnega testiranja NAT v Sloveniji nas uvršča med dežele z nizko prekuženostjo s HCV in HIV ter visoko s HBV. Slovenija se s 3-odstotno prevalenco protiteles anti-HBc med krvodajalci umešča med regije s srednje veliko prekuženostjo s HBV.<sup>22</sup> Prevalenca okužb OBI, (6/10<sup>5</sup>) je primerljiva s prevalenco v sredozemskih državah ter vzhodnoevropskih in baltskih državah.<sup>7-8,23-26</sup> ter višja od prevalence v zahodno- in severnoevropskih regijah.<sup>4-6,8</sup>

Ob odkrivanju teh tih okužb med večkratnimi dajalci pa se soočamo z novimi vprašanji in izzivi. Dajalcu, ki je večkrat daroval kri, moramo obrazložiti nova spoznanja o njegovi okužbi in ga zavriniti kot krvodajalca. Raziskati bi bilo potrebno predhodne odvzeme in vpletene prejemnike ter ugotoviti, ali so bile transfundirane komponente izvor morebitne okužbe, predvsem kadar ni dovolj empiričnih podatkov, ki bi bili osnova za napoved verjetnosti prenosa okužb.<sup>27</sup>

V raziskavi verjetnosti prenosa okužb s transfuzijami komponent predhodnih odvzemov 5 krvodajalcev, ki smo jo izvedli v prvem letu testiranja NAT za HBV, nismo potrdili nobenega prenosa okužbe. Analizirali smo 21 odvzemov in pridobili podatke o 33 prejemnikih. Pri nobenem od teh prejemnikov ni bil klinično diagnosticiran hepatitis. Laboratorijsko pa smo zaznali označevalce prebolevanja HBV okužbe, vendar ni bilo mogoče izključiti pasivnega prenosa protiteles s transfuzijo oziroma prisotnosti protiteles pred transfuzijo.

Pri OBI virusno breme niha, torej ni vsaka donacija HBV DNA pozitivna. Še zlasti je vprašljiva kužnost ob hkratni prisotnosti

nevtalizirajočih protiteles anti-HBs.<sup>12-14,28</sup> Ključna je torej analiza ocene tveganja v povezavi med virusnim bremenom in količino transfundirane krvne komponente ob hkratnem upoštevanju drugih okoliščin (prisotnost protiteles, imunski status prejemnika, volumen transfundirane plazme, mutacija virusa).<sup>12-14</sup>

Upoštevati je potrebno tudi Poissonovo distribucijo, ki utemeljuje verjetnost uspešnega odvzema odmerka vzorca za testiranje. V plazmi z zelo majhnim virusnim bremenom se z veliko verjetnostjo lahko zgodi, da odvezamo in z NAT testiramo del plazme, ki ne vsebuje virusa in tako (pravilno) pridobimo negativen rezultat, v nekem drugem poizkusu pa pozitivnega, saj smo uspešno zajeli virus in namnožili izbrani genom.<sup>29</sup>

## Zaključek

Uvedba presejalnega testa na tri viruse s tehnologijo NAT v posameznih donacijah krvi je vsekakor povečala možnost zagotavljanja varnejše krvi in so jo zdravstvene oblasti v večini razvitih držav predpisale. Zaveza strokovnjakov, ki se ukvarjamo s preskrbo s krvjo, je našim bolnikom, prejemnikom krvi ali njenih sestavin zagotoviti varnost in učinkovitost krvi kot zdravila. Poročila o prenosu okužb ali sumu prenosov ter njihove analize kažejo, da je transfuzija danes varna oblika zdravljenja, vredna zaupanja vseh uporabnikov v postopkih zdravljenja s krvjo.<sup>30</sup>

## Literatura

- Direktiva 2002/98/ES Evropskega parlamenta in sveta z dne 27. januarja 2003 o določitvi standardov kakovosti in varnosti za zbiranje, preskušanje, predelavo, shranjevanje in razdeljevanje človeške krvi in komponent krvi ter o spremembi Direktive 2001/83/ES. UL Evropske skupnosti, 2003.
- Zakon o preskrbi s krvjo, Ur l 104/2006.
- Dwyre DM, Fernando LP, Holland PV. Hepatitis B, hepatitis C and HIV transfusion-transmitted infections in the 21st century. *Vox sang.* 2011; 100: 92–8.
- Pillonel J, Laperche S. Trends in risk of transfusion transmitted viral infections (HIV, HCV, HBV) in France between 1992 and 2003 and impact of nucleic acid testing (NAT). *Eurosurveillance* 2005; 10: 5–8.
- Dodd RY, Notari EP, Stramer SL. Current prevalence and incidence of infectious disease markers and estimated window-period risk in the American Red Cross blood donor population. *Transfusion.* 2002; 42: 975–9.
- Hourfar MK, Jork C, Schottstedt V, Weber-Schehl M, Brixner V, Busch MP, et al. Experience of German Red Cross blood donor services with nucleic acid testing: results of screening more than 30 million blood donations for human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus. *Transfusion.* 2008; 48: 1541–4.
- Velati C, Romano L, Fomiatti L, Baruffi L, Zanetti AR, the SIMTI Research Group. Impact of nucleic acid testing for hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus on the safety of blood supply in Italy: a 6 year survey. *Transfusion.* 2008; 48: 2205–13.
- Roth WK, Busch MP, Schuller A, Ismay S, Cheng A, Seed CR, et al. International survey on NAT testing of blood donations: expanding implementation and yield from 1999 to 2009. *Vox Sang.* 2012; 102: 82–90.
- Weusten J, Vermuelen M, van Drimmelen H, Lelie N. Refinement of a viral transmission risk model for blood donations in seroconversion window phase screened by nucleic acid testing in different pool sizes and repeat test algorithms. *Transfusion.* 2011; 51: 203–15.
- Busch PM, Glynn SA, Stramer SL, Strong MD, Caglioti S, Wright DJ, et al. A new strategy for estimating risks of transfusion-transmitted viral infections based on rates of detection of recently infected donors. *Transfusion.* 2005; 45: 254–64.
- Assal A, Barlet V, Deschaseaux M, Dupont I, Gallian P, Guitton C, et al. Comparison of the analytical and operational performance of two viral nucleic acid test blood screening systems: Procleix Tigris and Cobas s 201. *Transfusion.* 2009; 49: 289–300.
- Allain JP. Occult hepatitis B virus infection: implication in transfusion. *Vox Sang.* 2004; 86: 83–91.
- Roth KW, Weber M, Petersen D, Drosten C, Buhr S, Sireis W, et al. NAT for HBV and anti-HBc testing increase blood safety. *Transfusion.* 2002; 42: 869–75.
- Gerlich WH, Wagner FF, Chudy M, Holm Harrishoj L, Lattermann A, Wienzek S, Glebe D. HBsAg Non-reactive HBV infection in blood donors: Transmission and pathogenicity. *J Med Virol.* 2007; 79(1 Suppl): S32–6.
- Seme K, Močilnik T, Fujs K, Babič Z D, Todorović A, Fras-Stefan T, Poljak M. Twenty-four mini-pool HCV RNA screening outside a blood transfusion setting: Results of a 2-year prospective study. *J Virol Methods.* 2007; 140: 218–21.
- Seme K, Močilnik T, Poljak M. Twenty-four mini-pool HCV RNA screening in a routine clinical virology laboratory setting: A six-year prospective study. *J Virol Methods.* 2011; 171: 303–5.
- Guidelines for Validation of Nucleic Acid Amplification Technology (NAT) for the Detection of Hepatitis C Virus (HCV) RNA in Plasma Pools.. Council of Europe, PA/PH/OMCL(98)22, DEF, 1999.
- Pravilnik o obveznem testiranju krvi na sledi okužb s povzročitelji bolezni, ki se prenašajo s krvjo. Ur l 100/2003.
- Pravilnik o obveznem testiranju krvi in komponent krvi. Ur l 9/2007.
- Marolt Gomilšček M, Radsel Medvešček A. Infekcijske bolezni. Ljubljana: Tangram; 2002.
- Klavs I, Kustec T, Kastelic Z. Okužba s HIV v Sloveniji v letu 2010. Ljubljana: Inštitut za varovanje zdravja, 2011. Dosegljivo na: [http://www.ivz.si/hiv\\_spo](http://www.ivz.si/hiv_spo).
- Levičnik Stezinar S, Jovanovič P. Prevalenca protitelov anti-HBc med krvodajalci v Sloveniji ter pomen pri presejalnem testiranju. *Zdrav vestn.*; 77(1 Suppl): 187–92.
- Castro E, Torees P, Gonzalez R, Ontanon A, Gonzalez Ponte L, Sedeno M, et al. Acute phase and occult HBV infections with multiple mutations in the surface antigen A determinant detected by HBV/HCV/HIV-1 TMA screening of Spanish blood donors. *Vox Sang.* 2006; 90(3 Suppl): 77.
- Politis CP, Karafoulidou AK, Theodori HT, Tsoukala AT, Andrioti EA, Tseliou PT, et al. Occult hepatitis B surveillance in blood donations in Greece. *Vox Sang.* 2007; 93(1 Suppl): 134.
- Kalibatas V, Irzikeviciene J, Lelie N. HBV and HCV infected blood donations interdicted by individual donation nucleic acid testing (ID-NAT) in Lithuania. *Vox Sang.* 2006; 90(3 Suppl): 83.
- Brojer E, Grabarczyk P, Liszewski G, Mikulska M, Allain JP, Letowska M. Characterization of HBV DNA(+)/HbsAg(-) blood donors in Poland identified by triplex NAT. *Hepatology.* 2006; 44: 1666–74.
- Allain JP, Reesink HW, Lucey C. A European perspective on the management of donors and units testing positive for hepatitis B virus DNA. *Transfusion.* 2006; 46: 1256–8.
- Levičnik Stezinar S, Rahne Potokar U, Candotti D, Lelie N, Allain JP. Anti-HBs positive occult hepatitis B virus carrier blood infectious in two transfusion recipients. *J Hepatol.* 2008; 48: 1022–5.
- Bustin AS, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Hugget J, Kubista M, Mueller R. The MIQE guidelines: Minimum information for Publication of Quantitative Real-Time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009; 55: 611–22.
- Potočnik M. hemovigilanca v Sloveniji v letu 2010. *ISIS* 2011: 49–55.