

# Dijagnostička infekcija hepatitis C virusom temeljena na PCR metodi

---

Lončarić, Maja

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:266534>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike**

**Maja Lončarić**

**DIJAGNOSTIKA INFEKCIJE HEPATITIS**  
**C VIRUSOM TEMELJENA NA METODI**  
**AMPLIFIKACIJE POTAKNUTE**  
**TRANSKRIPCIJOM (TMA)**

**Završni rad**

**Osijek, 2016.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**Studij medicinsko laboratorijske dijagnostike**

**Maja Lončarić**

**DIJAGNOSTIKA INFEKCIJE HEPATITIS**  
**C VIRUSOM TEMELJENA NA METODI**  
**AMPLIFIKACIJE POTAKNUTE**  
**TRANSKRIPCIJOM (TMA)**

**Završni rad**

**Osijek, 2016.**

Rad je ostvaren u Kliničkom bolničkom centru Osijek.

Mentorica rada: doc. dr. sc. Snježana Džijan

Rad ima 29 listova, 9 tablica i 3 slike.

## **Zahvala**

Zahvaljujem mentorici, doc. dr. sc. Snježani Džijan na podršci, pomoći, savjetima i vrlo ugodnoj suradnji.

Zahvaljujem prof. prim. dr. sc. Marini Samardžiji, dr. med. na velikodušnoj pomoći tijekom izrade završnog rada.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Domagoju Drenjančeviću, dr. med. na korisnom savjetima tijekom studiranja i izrade završnog rada.

Zahvaljujem Daliboru Ratiću, mag. med. techn. na savjetovanju, pomoći i usmjeravanjima tijekom izrade završnog rada.

Zahvaljujem kolegicama i kolegama Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek na razumijevanju, strpljenju, pomoći i susretljivosti.

Ponajviše zahvaljujem suprugu, roditeljima, baki, djedu i prijateljima na podršci, razumijevanju i strpljenju tijekom posljednje tri godine.

## Sadržaj

<b>Popis kratica</b> .....	II
<b>1. Uvod</b> .....	1
1.1. Transfuzijska medicina.....	1
1.1.1. Davatelji krvi .....	1
1.1.2. Krvni pripravci.....	2
1.1.3. Rizici transfuzijskog liječenja .....	2
1.2. Uzročnici krvlju prenosivih bolesti .....	3
1.3. Virus hepatitisa C.....	4
1.3.1. Građa .....	5
1.3.2. Umnožavanje.....	6
1.3.3. Genotipovi .....	7
1.3.4. Putevi prijenosa infekcije hepatitisom C .....	8
1.3.5. Patogeneza infekcije .....	8
1.3.6. Klinička slika.....	9
1.3.6.1. Akutni i kronični hepatitis C.....	9
1.3.6.2. Okultni hepatitis C.....	10
<b>2. Ciljevi</b> .....	11
<b>3. Materijali i metode</b> .....	12
3.1. Uzorci.....	12
3.2. Metode .....	13
3.2.1. Serološka dijagnostika infekcije virusom hepatitisa C.....	13
3.2.2. Molekularna dijagnostika infekcije virusom hepatitisa C .....	15
3.3. Statističke metode .....	19
<b>4. Rezultati</b> .....	20
<b>5. Rasprava</b> .....	22
<b>6. Zaključci</b> .....	24
<b>7. Sažetak</b> .....	25
<b>8. Summary</b> .....	26
<b>9. Literatura</b> .....	27
<b>10. Životopis</b> .....	29

## Popis kratica

**anti-HCV** – hepatitis C antitijela

**DC-SIGN** – engl. *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3- grabbing non integrin*

**DDK** – dobrovoljni davatelji krvi

**dHCV** – diskriminacijski hepatitis C test

**EIA** – enzimski imunotest (engl. *enzyme immunoassay*)

**ELISA** – engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*

**HCV** – hepatitis C virus

**HCV Ag** – hepatitis C antigen

**HCV-RNA** – genom virusa hepatitisa C

**HIV** – virus humane imunodeficijencije (engl. *Human immunodeficiency virus*)

**HPA** – test zaštite hibridizacije (engl. *Hybridization Protection Assay*)

**HVR-1** – hipervarijabilna regija 1 (engl. *hypervariable region 1*)

**HZTM** – Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

**IRES** – mjesto ulaska ribosoma (engl. *Internal Ribosomal Entry Site*)

**KZTM** – Klinički zavod za transfuzijsku medicinu

**L-SIGN** – engl. *liver/lymph node- specific intercellular adhesion molecule-3- grabbing integrin*

**M-MLV RT** – Moloney murin leukemija virus reverzna transkriptaza (engl. *Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase*)

**mRNA** – glasnička RNA (engl. *messenger RNA*)

**NAT** – tehnika umnažanja nukleinskih kiselina (engl. *Nucleic Acid Amplification Testing*)

**OD** – optička gustoća (engl. *Optical Density*)

**ORF** – otvoreno područje kodiranja (engl. *Open Reading Frame*)

**RLU** – relativne svjetlosne jedinice (engl. *Relative Light Units*)

**RNA** – ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)

**S/CO** – omjer signala i cut-offa (engl. *signal-to-cut-off ratio*)

**SR-BI** – engl. *scavenger receptor B type*

**TMA** – amplifikacija potaknuta transkripcijom (engl. *Transcription Mediated Amplification*)

**wp** – dijagnostički prozor (engl. *window period*)

# 1. Uvod

## 1.1. Transfuzijska medicina

Transfuzijska medicina je grana medicine koja se bavi proizvodnjom krvnih pripravaka od ljudske krvi i liječenjem bolesnika lijekovima proizvedenima od ljudske krvi. Obuhvaća sve postupke u proizvodnji krvnih pripravaka, laboratorijskom testiranju i bolesnikovu liječenju od davateljeve do bolesnikove vene. Za razliku od drugih medicinskih struka gdje je središnji interes bolesnik, u transfuzijskoj su medicini jednako značajni bolesnik i davatelj krvi (1).

Stoljećima se vjerovalo da je krv dio tijela u kojem su pohranjeni život, zdravlje i snaga. U 17. stoljeću otkrićem Williama Harveya o kruženju krvi kroz čovjekovo tijelo došlo je do pomnijeg istraživanja transfuzije krvi s uspješnim eksperimentalnim transfuzijama krvi među životinjama. Pokušaji transfuzije među ljudima i dalje su imali pogubne posljedice. Zbog nepoznavanja krvnih grupa i poslijetransfuzijske hemolitičke reakcije, posljedična smrt bolesnika bila je vrlo česta. Suvremena era u transfuzijskoj medicini započinje otkrićem Karla Landsteinera koji je 1900. godine otkrio ABO sustav krvnih grupa. Nakon toga otkriveno je da se dodavanjem antikoagulansa i čuvanjem krvi u hladnjacima ona može skladištiti nekoliko dana. 1914. godine Albert Hustin prvi je koristio natrijev citrat kao antikoagulans. 1940. godine Karl Landsteiner, Alex Wiener, Philip Levine i R.E. Stetson dolaze do velikog i važnog otkrića sustava Rhesus krvnih grupa (Rh), nakon čega se ispostavilo da je veći dio transfuzijskih reakcija bio uzrokovan njihovom inkompatibilnosti. U tom periodu dolazi i do otkrića metode za razdvajanje krvi na krvnu plazmu i crvene krvne stanice te do toga da se navedene krvne komponente mogu odvojeno pohranjivati. Krv pohranjena na ovaj način trajala je dulje i mogućnost da će doći do njene kontaminacije bila je mnogo manja. Razvoj transfuzijske medicine u Hrvatskoj nije znatno zaostajao za razvojem u svijetu (1, 2, 3).

### 1.1.1. Davatelji krvi

U početku transfuzije dobrovoljni su davatelji krvi (DDK) bili bolesnikovi članovi obitelji. No, članovi obitelji nisu uvijek mogli zadovoljiti potrebe bolesnika za krvnim pripravcima, posebno ne u liječenju hitnih i akutnih stanja ili kada su bolesniku bili potrebni krvni pripravci posebnih krvnih grupa ili drugih značajki. To je razlog širenja davalaštva na sve društvene skupine i njegova organiziranja na humanističkim načelima dobrovoljnosti, besplatnosti,



anonimnosti i solidarnosti (1).

Davatelji krvi mogu biti sve zdrave osobe za koje je doktor medicine pregledom utvrdio da mogu dati krv ili krvni sastojak bez opasnosti za svoje zdravlje, a transfuzija krvnih pripravaka priređenih iz njegove krvi ili krvnog sastojka neće ugroziti zdravlje primatelja. Prije darivanja krvi DDK ispunjava upitnik koji se sastoji od pitanja na temelju kojih liječnik pri pregledu donosi zaključak može li se njegova krv upotrijebiti za liječenje bolesnika. Sve informacije dobivene od DDK liječnička su tajna. Osnovni kriteriji odabira davatelja krvi su:

1. dob ispitanika: između 18 i 65 godina
2. tjelesna težina: iznad 55 kg ili proporcionalna visini
3. tjelesna temperatura: do 37 °C
4. krvni tlak: sistolični 100 do 180 mm Hg, dijastolični 60 do 110 mm Hg
5. puls: 50 do 100 otkucaja u minuti
6. hemoglobin: muškarci 135 g/L, žene 125 g/L
7. pregled i odluka liječnika (4).

### **1.1.2. Krvni pripravci**

Krvni pripravci su lijekovi biološkog podrijetla. Proizvode se jednostavnim fizikalnim postupcima od ljudske krvi u ustanovama za transfuzijsku djelatnost. Krvni su pripravci posebna skupina lijekova. Učinkovitost i sigurnost ove skupine lijekova u transfuzijskom liječenju ovisi o značajkama davateljeve krvi, tj. sirovini od koje se proizvode, te o ostalim postupcima u proizvodnji, laboratorijskom testiranju i transfuzijskom liječenju. Pripravci su eritrocitni, trombocitni i granulocitni, zatim pripravci plazme i krioprecipitat (1).

### **1.1.3. Rizici transfuzijskog liječenja**

Svaka transfuzija krvi nosi rizike nuspojava usprkos svim postupcima koji se poduzimaju da bi transfuzijsko liječenje bolesnika bilo što sigurnije. U transfuzijskoj medicini rizik znači opasnost od nastanka nuspojava liječenja krvlju ili krvnim pripravcima ili šteta koja je uzrokovana pogrješkama.

Nuspojave transfuzijskog liječenja mogu biti: imunizacija na tuđe antigene, posljedice promjene imunološkog sustava, reakcije na promjene u krvnom pripravku (tzv. metaboličke reakcije), posljedice zaraze uzročnicima krvlju prenosivih bolesti i nuspojave uzrokovane lošim

transfuzijskim liječenjem. Težina i učestalost nuspojava ovise o značajkama krvnih pripravaka, načinima njihove primjene, bolesnikovom stanju i bolesti, trajanju i učestalosti transfuzijskog liječenja te o pažnji kojom se prati bolesnik tijekom i nakon transfuzije.

Pogrješke neminovno nastaju u svakom radu. Samo mali broj pogrješaka uzrokuje nuspojave i/ili štetu, jer se većina pogrješaka prepoznata na vrijeme te se planiranim ili neplaniranim djelovanjem spriječe njezine posljedice i šteta koju bi uzrokovale. Malokad su posljedica neznanja ili su namjerno napravljene. Veći udio ljudskih pogrješaka u ukupnom uzroku nuspojava, nezgoda i šteta posljedica je sve veće složenosti liječenja i povećanja tehnološke sigurnosti aparata. Edukacijom, boljom organizacijom i boljim uvjetima rada, kao i uvođenjem automatizacije, računala i strojeva može se smanjiti učestalost pogrješaka (1).

## 1.2. Uzročnici krvlju prenosivih bolesti

Jedan od rizika transfuzijskog liječenja je prijenos zaraznih bolesti. Zarazne bolesti prenosive lijekovima od krvi mogu biti uzrokovane virusima, bakterijama, parazitima i prionima (Tablica 1). Samo su neki uzročnici veliki javnozdravstveni problem, dok je većina sporadično opasna. Sve uzročnike koji se mogu prenijeti krvlju nije moguće testirati i zato se testiraju oni koji su propisani zakonima, ovisno o prevalenciji, epidemiološkoj situaciji, endemskim područjima i socijalno-ekonomskom statusu zemlje.

**Tablica 1.** Uzročnici zaraznih bolesti prenosivih krvlju

<b>Bakterije</b>	<i>Treponema pallidum</i> <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Klebsiella</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp.	<i>Enterobacter</i> spp. <i>Escherichia coli</i>
<b>Virusi</b>	Hepatitis A, B, C HIV 1/ 2 Humani T-limfotropni virus (HTLV) 1/ 2	Citomegalovirus (CMV) Epstein Barr virus (EBV) <i>Parvo virus</i> B-19	<i>West Nile virus</i> Humani herpes virus (HHV)
<b>Paraziti</b>	<i>Plasmodium malariae</i> <i>Babesia</i>	<i>Toxoplasma gondii</i> <i>Microfilaria</i>	<i>Leishmania</i> <i>Trypanosoma cruzi</i>
<b>Prioni</b>	Uzročnici Creutzfeldt Jakobove bolesti i njihove varijante		

Testiranje krvi na krvlju prenosive bolesti regulirano je zakonskim aktima: Zakonom o krvi i krvni pripravcima (NN79/06 i 124/11), Pravilnikom o osiguranju kvalitete krvi i krvnih pripravaka u zdravstvenim ustanovama (NN80/07 i NN18/09), Pravilnikom o sustavu sljedivosti krvnih pripravaka i praćenju ozbiljnih štetnih događaja i ozbiljnih štetnih reakcija (NN63/07), Zakonom o održivom gospodarenju otpadom (NN94/13) i Odlukom Ministra zdravlja iz 2012. godine, kojom se Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu (HZTM) obvezuje na uvođenje ID-NAT testiranja svih davatelja krvi Republike Hrvatske (provedeno s 1. ožujka 2013. godine). HZTM donosi algoritme potvrdnog testiranja pozitivnih i nejasnih rezultata ID-NAT i obaveznih seroloških testova temeljem kojih se provodi evaluacija doza i davatelja krvi u transfuzijskoj djelatnosti Republike Hrvatske. U Republici Hrvatskoj obvezno je testiranje DDK na:

1. hepatitis B
2. hepatitis C
3. HIV 1 / 2
4. sifilis (4).

### **1.3. Virus hepatitisa C**

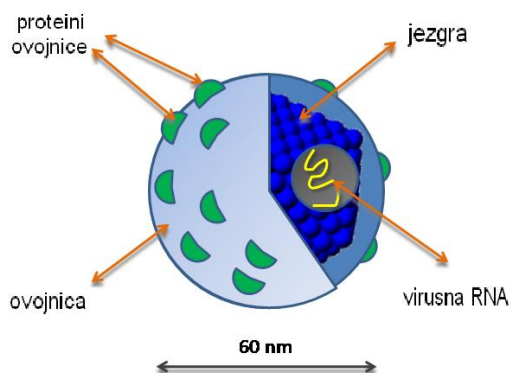
Virus hepatitisa C (HCV) najčešći je uzrok kronične bolesti jetre u svijetu. Prema procjeni Svjetske zdravstvene organizacije za 2016. godinu, između 120 i 150 milijuna ljudi kronično je inficirano virusom hepatitisa C, a oko 700 000 ljudi godišnje umire od kroničnih bolesti jetre uzrokovanih ovim virusom (15).

Infekcija virusom hepatitisa C prenesena krvnim pripravcima nastaje najčešće od davatelja u ranoj fazi infekcije. Dokazuje se ispitivanjem krvi davatelja na HCV genom (HCV-RNA) i HCV antitijela (anti-HCV). Dokazivanje HCV-RNA u plazmi molekularnim postupcima uveli su 1997. godine proizvođači derivata dobivenih iz ljudske plazme, kako bi smanjili rizik prenošenja HCV-a. Molekularnim se testiranjem rizik od prijenosa smanjuje na neznatnu razinu. U Europi, prema podacima do 2010. godine, prinos se kreće do 4 HCV pozitivne doze na milijun donacija. Gotovo svi (98 %) otkriveni davatelji bili su u razdoblju dijagnostičkog prozora (engl. *window period; wp*). Dijagnostički prozor je razdoblje u kojem je krv zarazna, ali ne postoji mogućnost dokazivanja antitijela u krvi zaražene osobe. Činjenica da su otkriveni davatelji bili u toku dijagnostičkog prozora dokazana je naknadnom serokonverzijom, tj. nakon infekcije, kada su se mogla dokazati specifična antitijela. Samo u 2 % slučajeva serokonverzija je izostala, dijelom kao

posljedica delecija u HCV genomu (5).

### 1.3.1. Građa virusa hepatitisa C

Virus hepatitisa C pripada rodu *Flaviviridae*. Virusna čestica je sferična oblika, veličine oko 60 nm. Nukleokapsida je promjera 30 nm, ovijena lipidnom ovojnicom na kojoj se nalaze glikoproteinski izdanci. Genom čini jednolančana pozitivna (+) RNA veličine ~9.6 nukleotida (Slika 1).



**Slika 1.** Građa virusa hepatitisa C

Izvor: <https://repositorij.mefst.unist.hr/islandora/object/mefst%3A1/datastream/PDF/view>

RNA sadrži tri regije:

- kratku nekodirajuću regiju na 5' kraju,
- veliko otvoreno područje kodiranja (engl. *Open Reading Frame*; ORF) i
- kratku nekodirajuću regiju na 3' kraju.

Produkt prevođenja ORF-a je poliprotein koji se posttranslacijski cijepa pomoću virusnih i staničnih proteaza u 10 proteina. Oni uključuju tri strukturalna proteina: protein kapside (C) i dva glikoproteina ovojnice (E1 i E2), pet nestrukturalnih proteina (NS3, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B), koji sudjeluju u procesu umnožavanja te dva proteina (p7 i NS2) koja imaju ulogu u sastavljanju virusne čestice (Slika 2) (Tablica 2). Prvih 27 aminokiselina glikoproteina E2 tvore tzv. hipervarijabilnu regiju (HVR-1) koja predstavlja najvarijabilniju regiju genoma i posjeduje epitope koji izazivaju stvaranje neutralizirajućih protutijela (12).



**Slika 2.** Organizacija genoma virusa hepatitisa C

Izvor: <http://www.natap.org/2001/jun/MoleBio.PDF>

**Tablica 2.** Proteini HCV i njihova funkcija tijekom umnožavanja virusa

Protein	Funkcija
Core (C)	vezanje s RNA, tvorba nukleokapside
E1	glikoprotein ovojnice
E2	glikoprotein ovojnice, vezanje za stanični receptor
p7	ionski kanal
NS2	komponenta proteaze
NS3	serinska proteaza
NS4A	replikacija genoma
NS4B	formiranje unutarstanične membranske strukture
NS5A	komponenta kompleksa replikaze
NS5B	RNA-ovisna RNA polimeraza

### 1.3.2. Umnožavanje virusa hepatitisa C

Umnožavanje HCV započinje vezanjem virusa za stanične receptore. Zatim se HCV „svlači“ i otpušta u citoplazmu pa se prevodi u poliprotein pomoću kompleksne strukture IRES (engl. *Internal Ribosomal Entry Site*) koja se nalazi na 5' kraju i veže se na 40S podjedinicu ribosoma te omogućuje početak translacije. Idući koraci su replikacija RNA, sastavljanje HCV, sazrijevanje HCV te izlazak iz stanice.

Postoje receptori specifični za pojedinu vrstu stanica. CD81 je transmembranski receptor koji se nalazi na mnogim humanim stanicama. Veže se s HCV E2. SR-BI je lipoproteinski receptor visoke gustoće koji se nalazi u hepatocitima i također se veže s HCV E2. DC-SIGN se nalazi na

dendritičkim stanicama, a L-SIGN na endotelnim stanicama jetrenih sinusoida i limfnih čvorova. Oba receptora olakšavaju ulazak HCV u hepatocite. Virus ulazi u stanicu endocitozom. Zbog niskog pH u endosomu dolazi do konformacijskih promjena proteina ovojnice, fuzije virusa s membranom endosoma te otpuštanja RNA u citoplazmu (17).

Genom djeluje kao mRNA i prevodi se u poliprotein. Strukturni se proteini cijepaju pomoću staničnih proteaza, a nestrukturni proteini pomoću virusne NS2-NS3 i NS3 proteaze. Nestrukturni se proteini spajaju i tvore kompleks replikaze na intracitoplazmatskim membranama koja kodira sintezu negativnog lanca RNA, a on služi kao kalup za sintezu pozitivnog lanca genoma. Novosintetizirana RNA spaja se s proteinom kapside i tvori nukleokapsidu. Virus dobiva ovojnicu pupanjem, a iz stanice se oslobađa egzocitozom ili lizom (12).

### **1.3.3. Genotipovi virusa hepatitisa C**

HCV u zaraženoj osobi obitava u formi kvazispecijesa. Virusna RNA polimeraza nema sposobnost prepoznavanja pogrešno umetnutih nukleotida tijekom umnožavanja niti djelotvornog popravka RNA što dovodi do brojnih genski različitih varijanti istog virusa u jednom domaćinu (14). Neki su genotipovi široko rasprostranjeni, dok se drugi pojavljuju na ograničenim geografskim područjima (23).

Osim geografske rasprostranjenosti, pojedini su podtipovi nađeni i u specifičnim rizičnim skupinama. U Europi, Americi i većem dijelu Azije 40 - 80 % HCV infekcija uzrokovano je genotipom 1. Genotip 1 ima dva podtipa: 1a, koji je najčešći u Sjevernoj Americi i 1b, koji je rasprostranjen na području Europe i Sjeverne Amerike. Genotip 2 prevladava na području Mediterana i u Aziji. Genotip 3 raširen je u intravenskih korisnika droga na području Europe, genotip 4 na Srednjem istoku, genotip 5 gotovo isključivo u Južnoj Africi te genotip 6 u jugoistočnoj Aziji. Istraživanje provedeno na području Hrvatske pokazalo je da su najčešći genotipovi 1 (58,8 %) i 3 (35,6 %). Učestalost genotipova 2 i 4 je niska (2,2 %, odnosno 3,4 %), dok genotipovi 5 i 6 nisu dokazani. Najzastupljeniji podtip je 1b, dokazan u 37,4 % te 1a u 13,1 % bolesnika (13).

#### **1.3.4. Putevi prijenosa infekcije virusom hepatitisa C**

Glavni put prijenosa HCV je perkutana izloženost zaraženoj krvi. Rizik prijenosa je najveći nakon transfuzije krvi i krvnih derivata od inficiranog davatelja krvi ili opetovane perkutane ekspozicije (uporaba kontaminiranog pribora pri intravenskoj primjeni droga). Kako se od 1993. godine DDK obavezno testiraju na anti-HCV protutijela, pojavnost novooboljelih putem krvnih pripravaka je minimalna (9). Hrvatska je zemlja niske prevalencije (manje od 2 % stanovnika ima anti-HCV protutijela). Prema serološkim istraživanjima, HCV seroprevalencija kreće se oko 0,5 %. Seroprevalencija anti-HCV protutijela u osoba koje prvi put dobrovoljno doniraju krv u Hrvatskoj je krajem devedesetih godina prošlog stoljeća iznosila oko 0,2 % te je u kontinuiranom blagom padu, tako da je zadnjih godina iznosila oko 0,1 %. S druge strane, neke podskupine stanovništva imaju znatno višu prevalenciju anti-HCV protutijela, a to su ponajprije intravenski korisnici droga u kojih je u Hrvatskoj utvrđena prevalencija i do 65 % (18). U slučajevima poznate ekspozicije za HCV, poput onih u zdravstvenih djelatnika, učestalost infekcije ne prelazi 1 %. Stopa prijenosa HCV infekcije nakon jednog uboda kontaminiranom injekcijskom iglom iznosi oko 3 % (1 - 6 %).

Uloga spolnog načina prijenosa HCV još uvijek nije potpuno razjašnjena. Na potencijalnu ulogu spolnog puta prijenosa upućuju podatci da je u područjima visoke HCV endemičnosti i visoke učestalosti spolno prenosivih bolesti prevalencija HCV niska u djece i adolescenata, a povećava se s dobi.

Do perinatalnog prijenosa HCV dolazi u oko 5 % slučajeva, što ovisi o stupnju viremije majke u vrijeme poroda. Rizik prijenosa infekcije na novorođenče je viši (5 - 36 %) ukoliko je majka istodobno inficirana i virusom HIV-a (12).

U čak 30 - 50 % zaraženih ne može se sa sigurnošću utvrditi put prijenosa.

#### **1.3.5. Patogeneza infekcije virusom hepatitisa C**

Hepatociti su primarno mjesto umnožavanja virusa i sadrže veliku količinu HCV-RNA ( $10^8$  -  $10^{11}$  kopija/gram tkiva). Virus se nalazi u citoplazmi hepatocita i ne ugrađuje se u genom stanice domaćina. Umnožavanje virusa je vrlo brzo ( $\sim 10^{12}$  virusnih čestica na dan). Patogeneza jetrenog oštećenja najvjerojatnije je posljedica izravnog citopatskog učinka virusnih proteina i imunoloških mehanizama posredovanih citotoksičnim limfocitima i citokinima (12).

### 1.3.6. Klinička slika infekcije virusom hepatitisa C

Infekcija hepatitis C virusom uobičajeno se prikazuje kao akutna infekcija, kronična infekcija, ili se očituje kao bolest izvan jetre. Inkubacija iznosi prosječno 6 - 8 tjedana.

#### 1.3.6.1. Akutni i kronični hepatitis C

Većina akutno inficiranih bolesnika nema simptoma i bolest je blaga. Žutica kao najprepoznatljiviji simptom, pojavljuje se u manje od četvrtine bolesnika. U samo 25 - 30 % osoba inficiranih hepatitis C virusom pojavljuju se netipični simptomi bolesti, stoga se na osnovi tih simptoma ne može zaključiti da se radi o upali jetre. Najčešći simptomi jesu umor, mučnina, povraćanje, gubitak apetita, bolnost ili nelagoda u gornjem desnom kvadrantu trbuha, povišena temperatura tijela i bolovi u zglobovima (22). Osnovne kliničke karakteristike hepatitisa C prikazane su u tablici 3.

**Tablica 3.** Osnovne kliničke karakteristike hepatitisa C

<b>Inkubacija</b>	2 - 22 tjedna, prosječno 6 - 8 tjedana
<b>Učestalost klinički manifestne akutne bolesti</b>	< 20 %
<b>Mortalitet kod akutnog hepatitisa</b>	nizak
<b>Kronična infekcija</b>	85 %
<b>Kronični hepatitis</b>	50 - 70 %
<b>Progresija u cirozu</b>	20 - 30 %

Fulminantni tijek akutnog hepatitisa C iznimno je rijedak. U 85 % zaraženih dolazi do asimptomatske progresije u kroničnu infekciju, od čega u 30 % inficiranih tijekom 20-ak godina dolazi do razvoja ciroze. Danas se smatra da je kronična HCV infekcija glavni uzrok terminalne faze jetrene bolesti (9).

Kronični hepatitis karakterizira perzistencija HCV-RNA u krvi dulje od šest mjeseci. Kao predisponirajući faktori za razvoj progresivne bolesti jetre navode se starija dob pri stjecanju infekcije (> 40 godina), muški spol i prekomjerno konzumiranje alkohola (12).



### ***1.3.6.2. Okultni hepatitis C***

Novi oblik hepatitisa C pod nazivom okultni hepatitis C opisan je 2004. godine. Karakterizira ga prisustvo HCV-RNA u jetri uz negativne anti-HCV i HCV-RNA biljege. Osim u jetri, u 70 % bolesnika HCV-RNA je dokazana i u mononuklearima periferne krvi (12). Okultna HCV infekcija raširena je diljem svijeta i svi su genotipovi HCV uključeni. Utvrđen je ne samo u anti-HCV pozitivnih osoba s vrijednostima jetrenih enzima unutar referentnog intervala ili kroničnog hepatitisa nepoznatog podrijetla, nego i u nekoliko skupina kojima prijete opasnost od infekcije HCV-om, kao što su hemodijalizirani pacijenti ili članovi obitelji bolesnika s okultnim HCV. Zabilježen je i u zdravoj populaciji bez dokaza o bolesti jetre. Čini se da je manje agresivan od kroničnog hepatitisa C, iako bolesnici pogođeni okultnom HCV infekcijom mogu razviti cirozu jetre, pa čak i hepatocelularni karcinom. Dugotrajna niska razina HCV-RNA u serumu i na mononuklearima periferne krvi, zajedno sa specifičnim odgovorom T-stanica protiv HCV antigena, pokazuju da je okultna HCV infekcija ustrajna infekcija koja ne prolazi spontano.

## 2. Ciljevi

Ciljevi ovog rada su:

1. ispitati zastupljenost pojedinih genotipova virusa hepatitisa C u svijetu i Republici Hrvatskoj,
2. prikazati čimbenike rizika za virus hepatitisa C,
3. ispitati učestalost HCV infekcije među populacijom dobrovoljnih davatelja krvi Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu (KZTM) Kliničkog bolničkog centra Osijek, u periodu od 1. svibnja 2013. godine do 1. svibnja 2016. godine,
4. ispitati ulogu rutinske molekularne metode u dijagnostici HCV infekcije kod populacije dobrovoljnih davatelja krvi s aspekta sigurnosti krvi i krvnih pripravaka u usporedbi sa serološkim testiranjem,
5. utvrditi broj (postotak) stvarno pozitivnih rezultata primjenom molekularnih metoda (ID-NAT test) i
6. analizirati podudarnost serološke i molekularne metode utvrđivanja HCV infekcije.

### 3. Materijali i metode

U ovom su radu korišteni rezultati analiza uzoraka krvi izuzetih od dobrovoljnih davatelja u KZTM Kliničkog bolničkog centra Osijek. Studija je ustrojena retrospektivno.

#### 3.1. Uzorci

Instrument istraživanja su rezultati serološkog testiranja (anti-HCV) krvi DDK rutinski testiranih na Odsjeku za serološku i imunohematološku dijagnostiku DDK KZTM Kliničkog bolničkog centra Osijek i molekularnog testiranja (HCV-RNA) krvi DDK rutinski testiranih na Odsjeku za NAT testiranje davatelja krvi HZTM u Zagrebu u periodu od 1. svibnja 2013. do 1. svibnja 2016. godine. Ispitanici su pristupali darivanju krvi na području Osječko-baranjske, Vukovarsko-srijemske, Brodsko-posavske i Virovitičko-podravske županije. U navedenom razdoblju prikupljeno je 81 225 donacija. Uzorci krvi su tijekom zaprimanja u laboratorij dobili jedinstveni barkod (engl. *barcode*) čime je identitet svakog pojedinog davatelja zaštićen. Rezultatima provedenih analiza krvi, dobivenih serološkim i molekularnim testiranjima, pristupano je kroz nacionalni informatički program *e-Delphyn*.

*E-Delphyn* je WEB aplikacija razvijena u španjolskoj tvrtki *Hemasoft*. U suradnji s proizvođačem, program je prilagođen zakonodavnoj transfuzijskoj praksi u Republici Hrvatskoj, zahtjevima Direktiva Europske Unije i preporukama struke. Program objedinjuje sve postupke transfuzijske službe od promidžbe i uzimanja krvi, preko proizvodnje, laboratorijskog testiranja, skladištenja i distribucije krvnog pripravka pa do izdavanja krvnog pripravka pacijentu i potvrde transfuzije. Program putem VPN podatkovne mreže radi u realnom vremenu paralelno u velikim i malim centrima i mobilnim jedinicama, jednostavan je za uporabu, ima intuitivno i prijateljsko sučelje te više razina pristupa kontroliranih lozinkama. Sljedivost pruža izravan pristup podacima od davatelja do pacijenta. Internetski se integrira s drugim aplikacijama i s laboratorijskom opremom. Sve se radnje korisnika bilježe i na taj je način omogućeno potpuno praćenje svih događaja u transfuzijskom lancu (20).

## 3.2. Metode

Laboratorijsko testiranje provodi se najprije testovima pretraživanja visoke osjetljivosti (engl. *screening*), rutinski najčešće enzimsko imunološkim EIA i ELISA testovima, certificiranim za *in vitro* dijagnostiku. Nedostatak ovih testova je taj što se zaraza ne može dokazati u toku dijagnostičkog prozora. Uvođenjem molekularnih testova značajno se skratio dijagnostički prozor.

Danas se dijagnostika HCV infekcije temelji na primjeni seroloških i molekularnih metoda. Ulaskom virusa u organizam dolazi do replikacije virusa i razvoja imunskog odgovora domaćina te se u serumu mogu detektirati virusna protutijela i HCV-RNA. Od protutijela u serumu prvo se pojavljuju protutijela usmjerena na regiju NS3 i protein kapside, a poslije na regiju NS4 te na E1 i E2. U molekularnoj dijagnostici koriste se testovi za kvalitativnu detekciju HCV-RNA. Serološka i molekularna dijagnostika detaljnije su opisani u idućim podpoglavljima.

### 3.2.1. Serološka dijagnostika infekcije virusom hepatitisa

Serološka dijagnostika u KZTM Kliničkog bolničkog centra odnosi se na EIA i ELISA testove. Reakcije se odvijaju u mikrotitarskim pločama s 96 reakcijskih jažica s pozitivnom i negativnom kontrolom prema protokolu proizvođača. Jažice su obložene HCV rekombinantnim antigenom. Specifičnost EIA testova iznosi više od 99 %.

U prvom koraku reakcije uzorci se inkubiraju u jažicama. U slučaju pozitivnih uzoraka, specifična protutijela vezat će se na antigene čvrste faze. Nevezane komponente odstranjuju se ispiranjem. Za detekciju vezanih protutijela provodi se druga inkubacija uporabom enzimskog konjugata - peroksidaze koji ima sposobnost obojenja reakcije. Završni korak ispiranja uklanja nevezane konjugate anti-humanih protutijela. Tijekom završne faze konjugirani enzim katalizira hidrolizu dodanog supstrata u obojeni produkt čiji se intenzitet mjeri na 450 i 650 nm pomoću optičkog čitača u instrumentu. Za svaki testirani uzorak detektiraju se dva signala u jažici mikrotitarske ploče. Prvo je očitavanje reakcijske smjese i jažice prije dodavanja supstrata. Drugo očitavanje je nakon inkubacije supstrata s enzimom. Prvo očitavanje oduzima se od drugog kako bi se dobila relativna vrijednost rezultata testa. Vrijednost testa (OD - optička gustoća; engl. *Optical Density*) uspoređuje se s graničnim vrijednostima (*cut-off*) izračunatima prema protokolu proizvođača i interpretira se krajnji rezultat. Sve korake reakcije automatski kontrolira softver instrumenta.

Interpretacija rezultata temelji se na vrijednosti testa:  $OD < cut-off - 10 \% < cut-off$  (19).

Rezultati s vrijednostima nižim od granične vrijednosti ukazuju da se u uzorku ne nalaze tražena protutijela koja se mogu detektirati. Inicijalno pozitivni uzorci, kojima su rezultati veći ili jednaki graničnoj vrijednosti, retestiraju se u duplikatu. Ponovljeno reaktivni uzorci potvrdno se testiraju u Referentnom centru za davatelje krvi HZTM u Zagrebu. Najčešće korišten potvrdni test za dokazivanje protutijela na antigene komponente HCV je *Western blot* te *imunoblot* (11).

Protutijela usmjerena na različite antigene HCV gotovo su uvijek prisutna u kroničnoj HCV infekciji. Testovi za dokazivanje anti-HCV kontinuirano se unaprjeđuju unošenjem dodatnih antigenskih komponenti. HCV antigen (HCV Ag) se pojavljuje rano, gotovo istodobno s HCV-RNA (u prosjeku 1-2 dana kasnije), a obzirom da perzistira oko dva mjeseca, vjerovalo se da bi HCV Ag test mogao biti alternativa molekularnoj dijagnostici. Međutim, još uvijek postoji ograničenje ovog testa u odnosu na molekularnu dijagnostiku zbog njegove niže osjetljivosti (16).

Anti-HCV može se najranije detektirati 6-8 tjedana testovima treće generacije imunoenzimskih testova (EIA-3) koji sadrže tri rekombinantna antigena: c22, c20 i NS5, što znači da se uz anti-HCV određuje i HCV Ag nukleokapside (16).

Svaki uzorak koji u probirnom serološkom testu pokaže negativan rezultat smatra se sukladnim. Svaki uzorak koji u serološkom testu pokaže inicijalno reaktivan rezultat, a potvrdno testiranje je negativno, smatra se potencijalno zaraznim i nesukladnim, dok se ne provede ponavljanje testiranja istim testom u duplikatu. Svi krvni pripravci priređeni iz doze s reaktivnim rezultatom serološkog probirnog testa moraju se izdvojiti u karantenu do ponavljanja testiranja. Ako je rezultat ponavljanja u duplikatu istim testom negativan/negativan, doza krvi smatra se sukladnom. Ako je rezultat ponavljanja istim testom pozitivan/pozitivan, negativan/pozitivan ili pozitivan/negativan, pripravci priređeni iz te donacije moraju se uništiti kako je to propisano Zakonom o održivom gospodarenju otpadom (6) i Pravilnikom o vrstama otpada. (7)

Serološka dijagnostika (ELISA/EIA) u KZTM Kliničkog bolničkog centra Osijek u razdoblju od 1. svibnja 2013. do 1. svibnja 2016. godine obavljena je na automatiziranim sustavima:

1. Quadriga Be Free/BEP III i BEP 2000 (Siemens); test Enzygnost anti-HCV 4.0,
2. BEP 2000 (Siemens); test Enzygnost anti-HCV 4.0 i Ortho HCV Version 3.0 ELISA,
3. Freedom EVOlyzer (DiaSorin); test anti-HCV Version 4.0,
4. Evolis (BioRad), test Monolisa aHCV Plus V3 i
5. Architect (Abbott); test anti-HCV.

### 3.2.2. Molekularna dijagnostika infekcije virusom hepatitisa C

Virus hepatitisa C sadrži 5' i 3' nekodirajuće regije. Na 5' kraju je regija visoke postojanosti i zbog toga je prikladna za molekularno dokazivanje virusnog genoma. To je uglavnom ciljna regija većine komercijalnih testova koji se zasnivaju na analizi virusnog genoma (8).

Genom virusa hepatitisa C (HCV-RNA) pojavljuje se u krvi rano tijekom infekcije, već oko 14. dana od ulaska virusa u organizam. HCV-RNA je prisutna u krvi tijekom akutne i kronične infekcije. Molekularnim se metodama može dokazati akutna infekcija u vrijeme dijagnostičkog prozora, tj. prije serokonverzije. Osim kvalitativnih testova, postoje i kvantitativni testovi kojima se određuje količina HCV-RNA u serumu, što je osobito korisno za praćenje učinka terapije. Granica osjetljivosti ovih testova iznosi 50 IU HCV-RNA/mL uzorka.

Vrlo važna značajka akutne HCV infekcije je varijabilnost razine HCV-RNA, od nekoliko stotina do 1 000 000 IU/mL. Na temelju tih fluktuacija može se razlikovati akutna od kronične HCV infekcije kod koje je razina HCV-RNA stabilna.

Rutinski se uz serološku obradu DDK uzimaju i uzorci za molekularno testiranje. U ovom se radu molekularno testiranje odnosi na NAT testiranje (engl. *Nucleic Acid Amplification Testing*) u koje pripada metoda amplifikacije potaknute transkripcijom ili TMA testiranje (engl. *Transcription Mediated Amplification*), u daljnjem tekstu ID-NAT koje se vrši *Procleix Ultrio Plus testom* na *Procleix Tigris System* automatiziranom sustavu. KZTM Kliničkog bolničkog centra Osijek, Odsjek za serološku i imunohematološku dijagnostiku DDK svakodnevno šalje uzorke krvi DDK za ID-NAT testiranje u HZTM u Zagreb koji obavlja molekularna testiranja. HZTM je jedina ustanova u Republici Hrvatskoj koja provodi ovaj test i to obavlja za sve donacije krvi u Republici Hrvatskoj. Transfuzijske ustanove Republike Hrvatske umrežene su preko *e-Delphyna* i rezultati se nakon svake obrade šalju kroz ovaj program.

Ponovljeno reaktivni ili nejasni rezultati dokazuju se testovima visoke specifičnosti (potvrđni testovi) također u HZTM. Svrha je potvrđnog testiranja nadzor nad zaraženima i sprječavanje širenja infekcije, poduzimanje mjera kojima se utječe na sigurnost krvi te pravovremeno liječenje zaraženih.

TMA metoda zasniva se na kombinaciji amplifikacijskih i detekcijskih metoda. Kvalitativni je *in vitro* test koji služi za amplifikaciju nukleinskih kiselina. Test se odvija u tri koraka:

1. priprema uzorka koja uključuje izdvajanje RNA pomoću detergenta koji otapa ovojnicu virusne stanice, denaturira proteine i otpušta virusni genom,

2. amplifikaciju HCV-RNA posredovanu transkripcijom i
3. detekciju amplikona, tj. produkata amplifikacije.

Nakon izdvajanja virusne RNA vrši se hibridizacija oligonukleotidnih proba koje su homologne ciljnim regijama HCV-RNA. Dodaje se reagens pojačivač (engl. *Target Enhancer Reagent*) da bi se uklonile moguće smetnje viralnih čestica hepatitisa B. Zatim se hibridizirane ciljne molekule uhvate na magnetske mikročestice koje se odvajaju od uzorka u magnetskom polju. Iza svakog koraka radi se ispiranje da bi se uklonile ostatne komponente. Za amplifikaciju RNA potaknutu transkripcijom koriste se enzimi M-MLV reverzna transkriptaza (engl. *Moloney Murine Leukemia Virus*; M-MLV RT) i T7 RNA polimeraza (engl. *T7 polymerase*). M-MLV RT proizvodi DNA kopije koje sadrže sekvence za T7 RNA polimerazu ciljne sekvence. T7 polimeraza zatim stvara više kopija RNA iz DNA predloška. Detekcija se postiže pomoću HPA metode (engl. *Hybridization Protection Assay*) koji koristi jednolančane probe označene kemiluminiscentnim obilježivačem koje su komplementarne amplikonu. Poseban reagens (engl. *Selection Reagent*) razlikuje hibridizirane i nehibridizirane probe tako što inaktivira obilježivač nehibridizirane probe. Kemiluminiscentni signal mjeri se u luminometru i iskazuje se relativnim svjetlosnim jedinicama (RLU). Sve korake automatski kontrolira softver instrumenta.

Izračun za *cut-off* vrijednost: negativna kontrola + 0,04 \* HCV pozitivna kontrola.

Prikaz interpretacije rezultata nalazi se u tablici 4 (10).

**Tablica 4.** Interpretacija rezultata Procleix Ultrio Plus testa

<b>Interpretacija</b>	<b>Rezultat</b>
<b>Nereaktivan</b>	S/CO < 1.00 i interna kontrola ≥ granična vrijednost ( <i>cut-off</i> ) interne kontrole i interna kontrola ≤ 650 000 RLU
<b>Reaktivan</b>	S/CO ≥ 1.00 i interna kontrola ≤ 650 000 RLU
<b>Nevažeći</b>	interna kontrola > 650 000 RLU ili S/CO < 1.00 i interna kontrola < <i>cut-off</i> interne kontrole

Prednost ovakvog testiranja je skraćivanje *wp* koji može biti i do 59 dana. U tablici 5 prikazana je prosječna vrijednost *wp* za HCV Procleix Ultrio Plus test (5). Specifičnost i osjetljivost testa iznose 100.00 % (10).

**Tablica 5.** Prosječne vrijednosti *wp* hepatitisa C

Test	Prosjek <i>window perioda</i> u danima	Osjetljivost IU/mL
ID-NAT	3 - 4	4,6 - 6,7
Anti-HCV	60	

U svakom se testu provodi interna kontrola koja kontrolira proces, amplifikaciju i detekciju. Mjeri se signal u svakoj reakcijskoj jažici i razlikuje pomoću diferencijalne emisije svjetla obilježenih proba. HCV specifični ampliconi detektiraju se pomoću proba sporije emisije svjetla („*glower signal*“), dok se ampliconi interne kontrole detektiraju pomoću proba brže emisije svjetla („*flasher signal*“). *Dual Kinetic Assay* je metoda koja razlikuje „*glower*“ i „*flasher*“ signale te se na taj način u testu odredi što je kontrola, a što uzorak.

Svaki uzorak koji u probirnom serološkom testu i molekularnom testu pokaže negativan rezultat smatra se sukladnim. Ako se serološkim i/ili molekularnim testiranjem dobije pozitivan rezultat, radi se daljnja obrada i sukladno rezultatima doza se pušta u promet ili uništava kako je propisano Zakonom o održivom gospodarenju otpadom (6) i Pravilnikom o vrstama otpada (7). U tablici 6 prikazano je tumačenje molekularnog i serološkog testiranja.



**Tablica 6.** Tumačenje rezultata ID-NAT i anti-HCV testa

Potvrđni test	Profil A	Profil B	Profil C
HCV-RNA	Pozitivan	Pozitivan	Negativan
Anti-HCV	Pozitivan	Negativan	Pozitivan
Tumačenje	Dokazana zaraza virusom hepatitisa C Šifra C1 - trajno odbijen zbog infekcije virusom hepatitisa C	Zaraza virusom hepatitisa C u <i>window periodu</i> Šifra C1/C4 - trajno odbijen zbog HCV infekcije u <i>window periodu</i> i Šifra C5 - trajno odbijen zbog okultne HCV infekcije	Razriješena zaraza virusom hepatitisa C. Moguća je intermitentna viremija. Šifra 2 - davatelj potencijalno zarazan Šifra C3 - nejasan imunoblot potvrđni test Šifra L/DF - negativan imunoblot potvrđni test, lažno pozitivan serološki test

Svi uzorci koji su bili reaktivni na ID-NAT test testiraju se diskriminacijskim testom (dHCV). dHCV se također sastoji od tri koraka, kao i ID-NAT test, s jednom razlikom. Umjesto reagensa *Procleix Ultrio Plus testa* koriste se HCV-specifični reagensi (10).

### **3.3. Statističke metode**

Kategorijski podatci prikazani su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Razlike kategorijskih varijabli testirane su hi-kvadrat testom. Statistička značajnost je postavljena na  $\alpha = 0,05$ . Podatci su statistički analizirani upotrebom informatičkog programa MedCalc verzije 14.8.1 i Microsoft Office Excel tabličnog kalkulatora.

## 4. Rezultati

Tijekom razdoblja od 1. svibnja 2013. do 1. svibnja 2016. godine u KZTM Kliničkog bolničkog centra Osijek prikupljeno je ukupno 81 225 donacija, od kojih je 64 075 višestrukih, redovnih, a „novih“ DDK koji su prvi puta darovali krv bilo je 17 150. U tablici 7 prikazana je podjela DDK prema spolu.

**Tablica 7.** Podjela DDK prema spolu

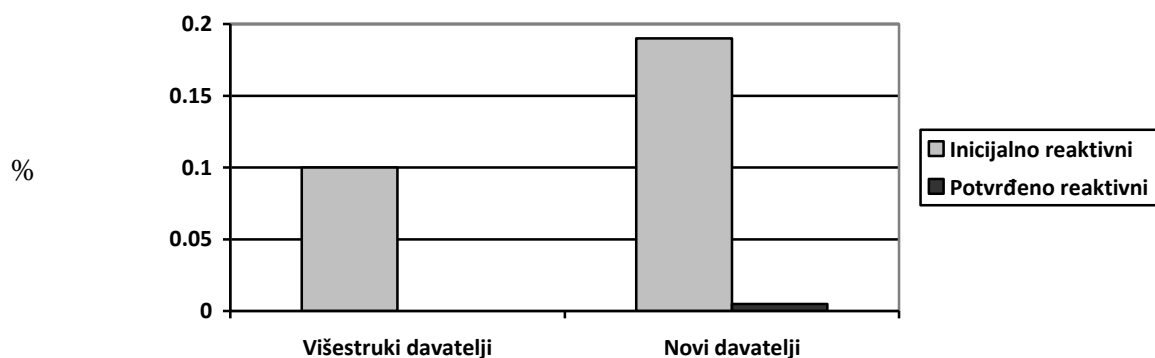
	Broj ispitanika (%)		
	Muškarci	Žene	Ukupan broj dobrovoljnih davatelja krvi
<b>Višestruki dobrovoljni davatelji krvi</b>	55 031 (85,89)	7 044 (10,99)	64 075 (78,89)
<b>„Novi“ dobrovoljni davatelji krvi</b>	12 822 (74,76)	4 328 (25,24)	17 150 (21,11)
<b>Ukupno</b>	68 853 (84,77)	12 372 (15,23)	81 225 (100)

Probirno reaktivnih uzoraka na krvlju prenosive bolesti je bilo 95, od toga 63 višestrukih, a „novih“ 32 (Tablica 8).

**Tablica 8.** Udio višestrukih i novih DDK s reaktivnim uzorkom

Dobrovoljni davatelji krvi	Ukupno	Broj (%) reaktivnih davatelja	Broj (%) potvrđeno reaktivnih davatelja u odnosu na ukupan broj	Broj (%) potvrđeno reaktivnih davatelja u odnosu na broj reaktivnih
<b>Višestruki</b>	64 075 (78,89)	63 (0,10)	-	-
<b>„Novi“</b>	17 150 (21,11)	32 (0,19)	4 (0,02)	4 (12,5)
<b>Ukupno</b>	81 225 (100,00)	95 (0,12)	4 (0,005)	4 (4,21)

Od ukupno 95 davatelja s inicijalno reaktivnim uzorkom na krvlju prenosive bolesti, četvero je potvrđeno reaktivno na hepatitis C (0,005 %). U skupini višestrukih davatelja od ukupno 63 (0,10 %) reaktivnih, nije potvrđeno pozitivna niti jedna donacija. U skupini novih davatelja, od ukupno 32 (0,19 %) reaktivnih, potvrđeno su pozitivne četiri (0,02 %) donacije (Slika 3). U tablici 9 nalazi se podjela muških i ženskih višestrukih i novih DDK s reaktivnim uzorkom.



**Slika 3.** Udio DDK (%) u odnosu na ukupno broj reaktivnih donacija

**Tablica 9.** Podjela višestrukih i novih DDK s reaktivnim uzorkom prema spolu

	Inicijalno reaktivni broj (%)	Potvrđeno reaktivni broj (%)	p*
<b>Muškarci - višestruki DDK</b>	55 (57,90)	-	
<b>Muškarci - novi DDK</b>	14 (14,74)	4 (28,57)	0,083
<b>Muškarci - ukupno</b>	69 (72,63)	4 (5,80)	< 0,001
<b>Žene - višestruki DDK</b>	9 (9,47)	-	
<b>Žene - novi DDK</b>	13 (13,68)	-	
<b>Žene - ukupno</b>	22 (23,16)	-	
<b>Ukupno</b>	91 (95,79)	4 (4,21)	< 0,001

\* Hi-kvadrat test

Statistički značajna razlika serološke i molekularne dijagnostike je ona kod koje je p vrijednost manja od 0,05. U ovom radu iznosi  $p < 0,001$ .

## 5. Rasprava

U ispitivanom razdoblju od 1. svibnja 2013. do 1. svibnja 2016. godine retrospektivno je praćena učestalost HCV biljega. Svaka donacija rutinski je testirana prema standardnim, zakonom propisanim serološkim i molekularnim metodama. Prema podacima proizvođača, osjetljivost i specifičnost seroloških testova kreće se vrlo visoko (iznad 99 %), dok je osjetljivost i specifičnost molekularnog (TMA) testa 100 %. To je vrlo važno u primjeni što sigurnijih krvnih pripravaka.

Učestalost reaktivnosti na ispitani biljeg u ispitivanom trogodišnjem razdoblju zabilježena je u vrlo niskom udjelu na ukupan broj donacija. Prevalencija zaraženih u ispitivanom uzorku kretala se od 0-1, dok je incidencija iznosila 0,005 % .

Seroprevalencija anti-HCV protutijela u osoba koje prvi puta dobrovoljno daruju krv u Hrvatskoj je krajem devedesetih godina prošlog stoljeća iznosila oko 0,2 % te je u kontinuiranom blagom padu, tako da je zadnjih godina iznosila oko 0,1 % (18).

Rezultati istraživanja u ovom radu podudaraju se s rezultatima u odnosu na cijelu Hrvatsku. Podudaraju se i s rezultatima studije o rasprostranjenosti u Europi koja pokazuje rasprostranjenost od 0 - 0,009 %, što znači da se učestalost zaraze virusom hepatitisa C u populaciji DDK nalazi se u okvirima prevalencije zemalja zapadne Europe (18, 21).

DDK predstavljaju populaciju s najnižom seroprevalencijom HCV infekcije u Republici Hrvatskoj (21). Od 95 serološki pozitivne donacije, molekularnim je testiranjem, odnosno TMA tehnologijom, ustanovljeno da su 91 donacija HCV-RNA negativne. Četiri su donacije potvrđeno pozitivne. Prvo im je utvrđen anti-HCV pozitivitet, a zatim i pozitivan rezultat ID-NAT probirnog testa. Nakon toga je rađen i diskriminacijski test (dHCV) koji je u sva četiri slučaja također bio pozitivan. Dobrovoljnim je davateljima krvi s pozitivnim diskriminacijskim testom dodijeljena šifra C1, što znači da su trajno odbijeni zbog infekcije virusom hepatitisa C (HCV-RNA i anti-HCV potvrđeno pozitivni). U Republici Hrvatskoj koristi se informatički program *e-Delphyn* koji ima objedinjenu bazu DDK sa svim donacijama i njihovim rezultatima. Prednost je ovog programa u tome što ne postoji mogućnost darivanja, odnosno uzimanja krvi DDK s potvrđenom HCV infekcijom bilo gdje na području Republike Hrvatske. Uvođenje ovog programa jedna je u nizu mjera povećanja sigurnosti i poboljšanja kvalitete prikupljenih donacija.

Usporedbom rezultata serološkog i molekularnog testiranja vidljivo je da je molekularno testiranje specifičnije i osjetljivije. Serološki pozitivnih testova bilo je 0,12 %, dok je molekularno pozitivnih testova bilo 0,005 % što uvelike pridonosi osiguranju sigurnosti krvi i krvnih pripravaka (tablica 8), a mogući rizik za prijenos virusa hepatitisa C krvnim pripravcima sveden je na najmanju moguću mjeru. U tablici 9 prikazana je usporedba serološkog i molekularnog testiranja iz koje se vidi da postoji statistički značajna razlika između navedenih metoda.

Javna se svijest o hepatitisu C povećava. Unaprjeđuju se postojeći testovi, a povećanju sigurnosti uvelike pridonosi i uvođenje molekularne dijagnostike.

Dijagnostika HCV infekcije eliminira krv dobrovoljnog davatelja krvi s HCV infekcijom i tako ispunjava zadaću transfuzije kojom treba pomoći primatelju, a da mu ne nanese štetu.

Kontinuirano osiguravanje sigurnosti krvi i krvnih pripravaka nužne su za prevenciju širenja hepatitisa C. Za sigurnost krvi i krvnih pripravaka, osim naprednih i pouzdanih postupaka testiranja krvi, važno je poznavati zakone, propise, preporuke te algoritme koji reguliraju primjenu krvnih pripravaka u liječenju. Uz financijsku potporu sustava te trajnu edukaciju zdravstvenih djelatnika, najvažniji su ljudi - prvenstveno zdravi, dobro educirani, moralno i etički motivirani davatelji krvi.

## 6. Zaključci

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- prema podacima iz korištene literature najzastupljeniji genotipovi virusa hepatitisa C u Republici Hrvatskoj su 1 (58,8 %) i 3 (35,6 %),
- u transfuzijskoj se medicini virus hepatitisa C može prenijeti krvnim pripravcima dobrovoljnog davatelja krvi u ranoj fazi infekcije, što je svedeno na najmanju moguću mjeru uvođenjem molekularnog testiranja,
- učestalost HCV infekcije među populacijom dobrovoljnih davatelja krvi KZTM Kliničkog bolničkog centra Osijek, u periodu od 1. svibnja 2013. godine do 1. svibnja 2016. godine, iznosi 0,005%, što je vrlo niski udio u odnosu na ukupan broj donacija,
- tijekom ispitivanog razdoblja u testiranju na hepatitis C u populaciji DDK reaktivnost je zabilježena samo u populaciji novih davatelja krvi,
- od 95 inicijalno reaktivnih uzoraka na virus hepatitisa C, koji su ispitani serološki, četiri uzorka su imala potvrđenu reaktivnost, što je utvrđeno molekularnim testiranjem, u ovom slučaju TMA metodom,
- nedostatak je serološkog testiranja taj što se zaraza ne može dokazati u toku dijagnostičkog prozora, tj. prije serokonverzije. TMA metodom to je moguće, stoga je molekularno testiranje sigurnije, specifičnije i osjetljivije od serološkog testiranja i
- uvođenjem molekularnog testiranja pridonosi se osiguranju sigurnosti krvi i krvnih pripravaka, a mogući rizik za prijenos virusa hepatitisa C krvnim pripravcima sveden je na najmanju moguću mjeru.

## 7. Sažetak

**Uvod:** Virus hepatitisa C najčešći je uzrok kronične bolesti jetre u svijetu. Glavni put prijenosa HCV je perkutana izloženost zaraženoj krvi. Rizik prijenosa je najveći nakon transfuzije krvi i krvnih derivata od inficiranog davatelja krvi ili opetovane perkutane ekspozicije. Nedostatak je serološkog testiranja u tome što se zaraza ne može dokazati u tijeku dijagnostičkog prozora. Da bi se skratilo vrijeme dijagnostičkog prozora, a time i rizik za prijenos infekcije, uvedene su molekularne metode za dokazivanje virusnog genoma u krvi (HCV-RNA).

**Ciljevi istraživanja:** Ciljevi rada bili su utvrđivanje broja stvarno pozitivnih rezultata primjenom metode amplifikacije potaknute transkripcijom (TMA) te analiziranje podudarnosti serološke i molekularne metode utvrđivanja HCV infekcije.

**Materijali i metode:** Instrument istraživanja bili su rezultati serološkog testiranja dobrovoljnih davatelja krvi (DDK) rutinski testiranih na Odsjeku za serološku i imunohematološku dijagnostiku Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek i molekularnog testiranja (HCV-RNA) rutinski testiranih na Odsjeku za NAT testiranje davatelja krvi Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu.

**Rezultati:** Od 1. svibnja 2013. do 1. svibnja 2016. godine prikupljeno je ukupno 81 225 donacija. Od ukupno 95 davatelja s inicijalno reaktivnim uzorkom na krvlju prenosive bolesti, njih četvero je potvrđeno reaktivno na hepatitis C.

**Zaključak:** DDK predstavljaju populaciju s najnižom seroprevalencijom HCV infekcije u Republici Hrvatskoj. Rezultati ovog rada (0,005 %) podudaraju se s rezultatima za područje Republike Hrvatske, kao i zapadne Europe (0 - 0,009 %).

**Ključne riječi:** dobrovoljni davatelji krvi, hepatitis C, metoda amplifikacije potaknute transkripcijom (TMA), tehnika umnažanja nukleinskih kiselina (NAT)



## 8. Summary

### **Diagnosis of hepatitis C virus infection based upon transcription mediated amplification (TMA) method**

**Introduction:** Hepatitis C virus is the leading cause of chronic liver disease worldwide. The main route of transmission of HCV is a percutaneous exposure to infected blood. The risk of transmission is greatest after transfusion of blood and blood products from infected blood donors or repeated percutaneous exposure. The disadvantage of serological testing is that infection can not be proved during the window period. To shorten the time of the window period, and thus the risk of transmission of infection, molecular methods have been introduced for the detection of viral genomes in blood (HCV-RNA).

**Objectives:** The aim of this study was to determine the number of true positive results using transcription mediated amplification (TMA) method and analyze the correlation of serological and molecular techniques for the detection of HCV infection.

**Material and methods:** The survey instrument were the results of voluntary blood donors serological tests tested at the Department of serological and immunohaematological diagnostics of Clinical Institute of Transfusion Medicine, Clinical Hospital Centre Osijek and molecular tests (HCV-RNA) tested at the Department of NAT testing of blood donors at Croatian Institute for Transfusion Medicine.

**Results:** From May 1st 2013 until May 1st 2016, total amount of blood donation was 81 225. From a total of 95 initially reactive results, four of them confirmed reactive for hepatitis C.

**Conclusion:** Blood donors represent population with the lowest seroprevalence of HCV infection in the Republic of Croatia. The results of this study (0,005 %) correspond to the results compared to the results for the Croatian Republic and Western Europe (0 to 0.009 %).

**Keywords:** blood donors, hepatitis C, nucleic acid amplification (NAT), transcription mediated amplification (TMA) method

## 9. Literatura

1. Grgičević D i suradnici. Transfuzijska medicina u kliničkoj praksi. Zagreb: Medicinska naklada; 2006.
2. Samardžija M. Krvlju prenosive bolesti. Osijek: Medicinski fakultet Osijek; 2011.
3. Grgičević D i Vuk. Imunohematologija i transfuzijska medicina. Zagreb: Medicinska naklada; 2000.
4. Zakon o krvi i krvnim pripravcima (NN79/06). Dostupno na adresi:  
<http://www.zakon.hr/z/511/Zakon-o-krvi-i-krvnim-pripravcima>. Datum pristupa: 1.8.2016.
5. Postupak evaluacije doza i davatelja krvi prema rezultatima NAT i seroloških testova u transfuzijskoj djelatnosti RH. Zagreb: Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu; 2016.
6. Zakon o održivom gospodarenju otpadom (NN94/13). Dostupno na adresi:  
[http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013\\_07\\_94\\_2123.html](http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_07_94_2123.html). Datum pristupa: 10.8.2016.
7. Pravilnik o vrstama otpada (NN34/95). Dostupno na adresi:  
[http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/1996\\_04\\_27\\_539.html](http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/1996_04_27_539.html). Datum pristupa: 10.8.2016.
8. Grahovac B, Hadžisejdić I. Molekularna dijagnostika hepatitisa C. Medicina; 2006; 42:132-7.
9. Vince A. Virusni hepatitis kao spolno prenosiva bolest. Medicus; 2003.
10. Procleix Ultrio Plus Assay package insert. Dostupno na adresi:  
<http://www.fda.gov/downloads/scienceresearch/fieldscience/ucm092120>. Datum pristupa: 20.7.2016.
11. Burek V. Dijagnostika virusnih hepatitisa. Hrvatski časopis za javno zdravstvo, Vol 4, broj 15; 2008.

12. Vilibić Čavlek T. Seroprevalencija i faktori rizika za infekciju virusom hepatitisa C u skupinama rizičnog spolnog ponašanja. Sveučilište u Zagrebu, Zagreb; 2009.
13. Vince A i sur. Distribution of hepatitis C virus genotypes in Croatia - a 10 year retrospective study of four geographic regions. Coll Antropol 2006; 30:139-43.
14. Cetinić Balent N i sur. Imunoenzimski test za određivanje protutijela na pojedinačne antigene virusa hepatitisa C kao potvrdni test u dijagnostici hepatitisa C. Infektološki glasnik; 2013; 33:3,109-15.
15. HepC WHO fact sheet. Dostupno na adresi:  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>. Datum pristupa: 19.7.2016.
16. Dorić A, Grahovac B. Hepatitis C u transfuzijskoj medicini. Medicina; 2007; 43:150-4.
17. Drazan KE. Molecular biology of hepatitis C infection. Liver Transpl 2000; 6:396-406.
18. Kaić B i sur. Epidemiologija virusnih hepatitisa. Acta Med Croatica, 2013; 67:273-79.
19. BioRad Monolisa Anti-HCV PLUS Version 3 package insert. Dostupno na adresi:  
[http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/en/883635\\_EN.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/en/883635_EN.pdf). Datum pristupa: 20.7.2016.
20. *e-Delphyn*: Uputa za rad sa davateljima. Hemasoft; 23.03.2013 ver.2.5.
21. Vilibić Čavlek T i sur. Epidemiology of hepatitis C in Croatia in the European context. World J Gastroenterol 2015; 21(32):9476-93.
22. Milić S, Mikolašević I. Hepatitis C - klinička slika i komplikacije. Medicina 2007; 43:118-22
23. Raspodjela genotipova virusa hepatitisa C. Dostupno na adresi:  
<http://hepcbc.ca/hcv-basics/>. Datum pristupa: 20.7.2016.

## **10. Životopis**

### **OSOBNI PODATCI**

**Ime i prezime:** Maja Lončarić

**Datum i mjesto rođenja:** 12. veljače 1984., Osijek

**Adresa stanovanja:** Prolaz Matice Hrvatske 2, Osijek

**E-mail:** mloncaric@mefos.hr

### **OBRAZOVANJE**

1991. - 1998. - osnovnoškolsko obrazovanje

1998. - 2002. - Medicinska škola Osijek, smjer zdravstveno laboratorijski tehničar

2013. - 2016. - Medicinski fakultet Osijek, preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

### **ZAPOSLENJE**

Klinički zavod za transfuzijsku medicinu (2005. - danas)

Klinički bolnički centar Osijek