

Obvezna serološka testiranja dobrovoljnih davatelja krvi

Slavulj, Marko

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:152:926631>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-03**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike

Marko Slavulj

**OBVEZNA SEROLOŠKA TESTIRANJA
U DOBROVOLJNIH DAVATELJA KRVI**

Završni rad

Osijek, 2016.

Rad je ostvaren u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek, Odjelu za serološku i imunohematološku dijagnostiku davatelja krvi, u suradnji s Odjelom za molekularnu dijagnostiku, Odsjekom za NAT testiranje dobrovoljnih davatelja krvi Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu, Petrova 3, Zagreb.

Mentor rada: prof. prim. dr. sc. Marina Samardžija, dr. med. specijalistica transfuziologije

Rad ima 45 listova, 15 tablica i 9 slika.

ZAHVALA

Iskrena zahvala mentorici, prof. prim. dr. sc. Marini Samardžija, dr. med. spec. transfuziologije na podršci i velikoj stručnoj pomoći.

Zahvaljujem se magistri med. biokemije Ivani Babić i djelatnicima NAT laboratorija Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu na savjetima i susretljivosti.

Iskrena zahvala zaručnici Nikolini i roditeljima na razumijevanju i podršci.

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. UZROČNICI ZARAZNIH BOLESTI PRENOSIVIH KRVLJU | 2 |
| 1.1.1. HEPATITIS B VIRUS (HBV)..... | 2 |
| 1.1.2. HEPATITIS C VIRUS (HCV)..... | 3 |
| 1.1.3. VIRUS HUMANE IMUNODEFICIJENCIJE (HIV) | 4 |
| 1.1.4. TREPONEMA PALLIDUM (TP) | 5 |
| 2. CILJEVI RADA | 6 |
| 3. ISPITANICI I METODE | 7 |
| 3.1. ISPITANICI..... | 7 |
| 3.1.1. UZORCI DONACIJA DOBROVOLJNIH DAVATELJA KRVI..... | 7 |
| 3.2. METODE..... | 8 |
| 3.2.1. SEROLOŠKA TESTIRANJA | 8 |
| 3.2.1.1. HBsAg | 9 |
| 3.2.1.2. ANTI-HCV..... | 10 |
| 3.2.1.3. HIV AG/AT..... | 10 |
| 3.2.1.4. ANTI-TP | 11 |
| 3.2.1.5. INTERPRETACIJA REZULTATA SEROLOŠKIH PROBIRNIH TESTOVA | 12 |
| 3.2.1.6. POTVRDNI SEROLOŠKI TESTOVI | 12 |
| 3.3. MOLEKULARNA TESTIRANJA..... | 13 |
| 3.3.1. ID-NAT TEST | 13 |
| 3.3.2. DISKRIMINACIJSKI TESTOVI..... | 14 |
| 3.4. EVALUACIJA DOZA I DAVATELJA KRVI PREMA REZULTATIMA ID-NAT-a I SEROLOŠKIH TESTOVA | 14 |
| 3.4.1. ALGORITMI EVALUACIJE DAVATELJA | 16 |

| | |
|---|----|
| 3.5. "WINDOW PERIOD" (WP) ILI "DIJAGNOSTIČKI PROZOR" | 20 |
| 3.6. PROFILI DDK-a | 21 |
| 3.7. ISKLJUČIVANJE I OBAVJEŠTAVANJE DOBROVOLJNOG DAVATELJA..... | 24 |
| 4. REZULTATI..... | 27 |
| 5. RASPRAVA..... | 33 |
| 6. ZAKLJUČCI | 37 |
| 7. SAŽETAK..... | 39 |
| 8. SUMMARY | 40 |
| 9. LITERATURA..... | 41 |
| 10. ŽIVOTOPIS | 45 |

POPIS KRATICA KORISTENIH U RADU (abecednim redom)

cccDNA - Covalently closed circle DNA (Kovalentno zatvorena kružna DNK)

CMV - Citomegalovirus

DAA - Direktni antivirusni agensi

DDK - Dobrovoljni davatelj krvi

dHBV - Diskriminacijski test hepatitis B virusa

dHCV - Diskriminacijski test hepatitis C virusa

dHIV-1 - Diskriminacijski test za virus humane imunodeficijencije

DNK - Deoksiribonukleinska kiselina

EIA - Enzimski imunotest

HAART - Highly active antiretroviral therapy (Antiretroviralna terapija visoke djelotvornosti)

HB Ig - Hepatitis B imunoglobulin

HBcAg - Hepatitis B core antigen (Hepatitis B jezgreni antigen)

HBeAg - Hepatitis B envelope antigen (Hepatitis B antigen ovojnice)

HBsAg - Hepatitis B surface antigen (Hepatitis B površinski antigen)

HBV - Hepatitis B virus

HBV DNK - Deoksiribonukleinska kiselina hepatitis B virusa

HCV - Hepatitis C virus

HCV RNK - Ribonukleinska kiselina Hepatitis C virusa

HCVAg - Hepatitis C virusni antigen

HIV - Virus humane imunodeficijencije

HIV Ag/At test - Kombinirani HIV antigen/antitijelo test

HIV1 RNK - Ribonukleinska kiselina virusa humane imunodeficijencije tipa 1

HRP - Peroksidaza hrena

HZTM - Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

ID-NAT - Individual donor nucleid acid testing (Individualno testiranje nukleinske kiseline davatelja)

IgG - Imunoglobulin klase G

IgM - Imunoglobulin klase M

IR - Inicijalno reaktivni

KBC Osijek - Klinički bolnički centar Osijek

OBI - Okultna hepatitis B infekcija

RH - Republika Hrvatska

RLU - Relativna svjetlosna jedinica

RNK - Ribonukleinska kiselina

RPR - Rapid plasma reagin (test za dokazivanje nespecifičnih antitijela koja mogu ukazivati na sifilis)

RR - Retestirano reaktivni

SARS - Severe Acute Respiratory Syndrome (Teški akutni respiratorni sindrom)

SZO - Svjetska zdravstvena organizacija

TMA - Transkripcijski ovisna amplifikacija

TMB - 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin

TP - Treponema Pallidum

TPHA - Treponema Pallidum hemaglutinacijski test (kvantitativni)

WP - Window period

1. UVOD

Krv je neprocjenjiv lijek, lijek koji nema identičnu farmakološku zamjenu. Transfuzija krvi je oblik transplantacije. Osobi u potrebi pruža pomoć koja je ponekad i od životne važnosti uz zadaću da toj osobi ne smije činiti štetu ni na koji način. Od samih začetaka transfuzije do danas otkriveno je više vrsta uzročnika zaraznih bolesti prenosivih krvlju. Neki su uzročnici otkriveni davno, T. Pallidum, citomegalovirus (CMV), neki nedavno, West Nile virus, Dengue virus, SARS. Nisu svi uzročnici jednako opasni. Kod nas i u svijetu veliki javnozdravstveni problem predstavljaju retrovirusi, virusi hepatitisa B i C. Zbog pojavljivanja nekog novog uzročnika koji predstavlja javnozdravstveni problem, s vremenom, u obvezno se testiranje uzoraka krvi donacija dobrovoljnih davatelja krvi (DDK) uvodio test za dokazivanje tog uzročnika u svrhu smanjenja rizika prijenosa zaraznih bolesti prenosivih krvlju. Izdvajanjem i zbrinjavanjem reaktivnih donacija krvi direktno se sprječava nastanak štete, odnosno nastanak infekcije ili bolesti koju uzročnik može prouzročiti u organizmu osobe koja je transfuziju krvi primila.

Sigurne transfuzije nema. Krv se smatra potencijalno zaraznom sve dok rezultati testiranja ne pokažu da u krvi nije prisutan niti jedan od uzročnika zaraznih bolesti na koje se krv testira. Svaka se donacija krvi pojedinačno testira serološkim i molekularnim testovima na prisutnost virusa hepatitisa B i C, virusa humane imunodeficijencije te na Treponemu Pallidum, bez obzira na broj darivanja krvi. Unatoč testiranjima, postoji razdoblje u kojem je moguć prijenos uzročnika zaraznih bolesti prenosivih krvlju nazvan „window period“, odnosno dijagnostički prozor. To je vremenski interval od ulaska uzročnika u organizam do trenutka kada serološkim odnosno molekularnim testovima možemo dokazati njegovu prisutnost. Serološka i molekularna obrada krvi dobrovoljnih davatelja krvi, uz njihov pravilan odabir, put je ka sigurnijem liječenju krvlju i krvnim pripravcima.

Testiranje krvi na krvlju prenosive bolest zahtjev je Zakona o krvi i krvnim pripravcima (NN 79/06 i 124/11), Pravilnika o osiguranju kvalitete krvi i krvnih pripravaka u zdravstvenim ustanovama (NN 80/07 i NN18/09), Pravilnika o sustavu slijedivosti krvnih pripravaka i praćenju ozbiljnih štetnih događaja i ozbiljnih štetnih reakcija (NN63/07), Zakona o održivom gospodarenju otpadom (NN94/13) i odluke Ministra zdravlja iz 2012. kojom se transfuzijske službe obvezuju na uvođenje ID-NAT testiranja svih davatelja krvi Republike Hrvatske (provedeno s 1.3.2013.). Zakoni RH usklađeni su sa 17. Preporukama Vijeća Europe. U svrhu

standardizacije i poboljšanja kvalitete kreirane su preporuke za testiranja s algoritmima temeljem kojih se provodi evaluacija doza i davatelja krvi u transfuzijskoj djelatnosti RH (1). Navedeni algoritmi te evaluacija doza biti će detaljnije objašnjeni u radu.

1.1. UZROČNICI ZARAZNIH BOLESTI PRENOSIVIH KRVlju

1.1.1. HEPATITIS B VIRUS (HBV)

Hepatitis je upalna bolest jetre koja može biti samolimitirajuća ili može dovesti do fibroze, ciroze i tumora jetre. Virus hepatitisa su najčešći uzrok hepatitisa u svijetu. Postoji 5 glavnih tipova hepatitisa, koji su označeni slovima od A do E. Poznati su i tipovi hepatitisa F, G i H. Za hepatitis D je poznato da ne može djelovati samostalno, već u koinfekciji s hepatitisom B (2).

Hepatitis B virus (HBV) je virus iz porodice Hepadnaviridae, rod Orthohepadnavirus. Građen je od dvostrukog lanca DNK, nukleokapsidne jezgre na kojoj se nalazi hepatitis B "core" antigen ili "HBcAg", koja je omotana lipoproteinskim omotačem, koji na sebi nosi hepatitis B "surface" antigen ili HBsAg, a u sebi sadrži HBeAg (3). Virus se prenosi kontaktom sa zaraženom krvi ili drugim tekućinama zaražene osobe i iz tog razloga najčešći prijenos je prijenos spolnim putem i u počecima korištenja krvi kao lijeka, transfuzijom. Danas je prijenos transfuzijom krvi moguć u vrlo rijetkim slučajevima. Prijenos virusa je moguć i ponovnom uporabom igle ili šprice od zaražene osobe, nesterilnim priborom pri tetoviranju, piercingu i akupunkturi, drugim ubodima ili ozljedama izazvanim oštrim predmetima koje upotrebljava medicinsko osoblje. Simptomi su žutilo očiju i kože, taman urin, mučnina i prekomjerni umor (2). Razdoblje inkubacije za hepatitis B virus u prosjeku iznosi 75 (30 - 180) dana, a za njegovu serološku detekciju u krvi potrebno je proći 30 do 60 dana ovisno o količini virusa i stanju imuniteta osobe (4).

Dok za akutni oblik hepatitisa B ne postoji specifični lijek, kronični oblik hepatitisa B se liječi Interferonom α -2b, Lamivudinom (Zeffix), Hepserom, ili kombinacijom lijekova Interferon i Lamivudin. Hepatitis B virus ima visoku sklonost mutacijama koje mogu nastati spontano, pod utjecajem cjepiva, antivirusnih lijekova, monoklonskih protutijela i hepatitis B imunoglobulina (HB Ig) (5, 6).

Negativan rezultat HBsAg testa možemo dobiti ukoliko je količina HBsAg-a ispod razine detekcije testa. Ta situacija može ukazivati na akutnu ili okultnu hepatitis B virusnu infekciju (OBI). U svrhu postavljanja dijagnoze OBI potrebno je učiniti HBV-DNK test. U velikom broju slučajeva, ukoliko je količina HBV DNK manja od donje granice osjetljivosti testa i tom metodom možemo dobiti negativan rezultat, što ne znači da replikacije virusa nema, već da se odvija u samom hepatocitu u vrlo malim količinama te da ne dolazi do "pupanja", odnosno izlaska virusa iz hepatocita.

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO) hepatitis B je globalni zdravstveni problem. Preko 240 milijuna ljudi u svijetu zaraženo je kroničnim oblikom hepatitisa B, a godišnje od posljedica virusne bolesti umire oko 780 000 ljudi (3). Velika se pažnja daje prevenciji zaraze hepatitisa B u obliku cijepljenja. Cijepljenje novorođenčadi u Republici Hrvatskoj (RH) je jedno vrijeme bilo u sklopu obaveznog cijepljenja, a sada se cijepi samo djeca majki nositeljica HBsAg virusa.

1.1.2. HEPATITIS C VIRUS (HCV)

Hepatitis C virus je jednolančani RNK virus iz porodice Flaviviridae, rod Hepacivirus. Nakon otkrića, zbog svoje različitosti u odnosu na hepatitis A i hepatitis B, nazvan je "Hepatitis non-A non-B". Na svijetu je 130 - 150 milijuna ljudi oboljelo od kroničnog oblika hepatitis C virusa, a svake godine umire oko pola milijuna od bolesti jetre uzrokovane HCV-om (7).

HCV je građen od jednostruke RNK uzvojnice koja je omotana vanjskim lipidnim omotačem. Proteini od kojih je građen su "core" ili jezgreni protein, protein omotača, glikoproteini E1 i E2 i mnoštvo drugih proteina koji reguliraju umnožavanje tog virusa (8). U svijetu je dosad otkriveno 6 osnovnih genotipova (1a, 1b, 1c, 2, 3, 4, 5, 6), od kojih su u Europi najzastupljeniji 1a, 1b i 1c, dok je u narkomana najprisutniji genotip 3. Zbog visoke sposobnosti mutacije tog virusa i stvaranja raznih podvrsta virusa, cjepivo za hepatitis C virus još nije pronađeno, jer se virus može razlikovati od čovjeka do čovjeka (7, 8). Podjela na genotipove i podtipove klinički je važna jer se može predvidjeti odgovor na terapiju i dužina liječenja.

Virus se također prenosi krvlju, najčešće zbog nekvalitetne sterilizacije medicinske opreme, transfuzije zaražene krvi (moguće za vrijeme WP-a), uboda inficiranim predmetom ili s majke na dijete u trudnoći. Inkubacijsko razdoblje traje od 2 tjedna do 6 mjeseci.

HCV, slično HBV-u, može uzrokovati akutnu i kroničnu infekciju. HCV infekcija je najčešće asimptomatska, vrlo rijetko ima vidljive simptome i nerijetko ljudi slučajno doznaju da su nositelji HCV-a. Od simptoma koji se javljaju, najčešći su: žutilo kože i bjeloočnica, mučnina, umor, povraćanje, bolovi u zglobovima i abdomenu. Vrlo često HCV kroničnu infekciju nazivaju "tihim ubojicom".

Ukoliko je tretman potreban, hepatitis C se liječi interferonom i ribavirinom, a u novije vrijeme direktnim antivirusnim agensima (DAA). Ti lijekovi su sigurniji, učinkovitiji i pacijenti ih bolje podnose. Tretman je kraći (12 tjedana), a učinkovitost puno veća (9). Za dokazivanje akutne HCV infekcije koristimo serološke testove za dokazivanje HCVAg-a i protutijela, anti-HCV. Molekularnom dijagnostikom potvrđujemo prisutnost ili odsutnost HCV RNK u uzorku (10).

1.1.3. VIRUS HUMANE IMUNODEFICIJENCIJE (HIV)

Virus humane imunodeficijencije je virus iz porodice Retroviridae. Može uzrokovati sindrom stečene imunodeficijencije ili AIDS. Osamdesetih godina 20. stoljeća taj je virus bio prisutan uglavnom kod haičana, hemofiličara, homoseksualaca i ovisnika o heroinu - "4H". U svijetu je oko 37 milijuna ljudi zaraženo virusom HIV-a s tendencijom povećanja tog broja za 2 milijuna godišnje. Godišnji se mortalitet kreće između 1 i 1.5 milijuna ljudi.

Virus HIV-a kuglastog je oblika, promjera 80 - 110 nm, ima cilindričnu kapsidu i dvoslojnu lipidnu ovojnica na kojoj se nalaze 72 glikoproteinska izdanka. Vanjski dio glikoproteinskih izdanaka strši iz lipidne ovojnice (gp 120), a unutrašnji dio je utisnut u lipidnu ovojnica (gp41). Središnji dio virusa čine četiri proteina nukleokapside (p24, p17, p9, p7). Temeljna komponenta nukleokapside je p24, koji se koristi u serološkoj dijagnostici za dokazivanje prisutnosti HIV-a. Protein p17 uspostavlja vezu između unutarnjih i vanjskih dijelova virusa, dok je protein p7 spojen izravno na virusnu RNK te zajedno s proteinom p9 tvori jezgru virusa. HIV sadrži diploidnu pozitivnu RNK uz koju su vezani enzimi reverzna transkriptaza (RT), integraza, ribonukleaza i proteaza (11).

Najpoznatija i najučinkovitija terapija u liječenju HIV-a je HAART (engl. highly active antiretroviral therapy). Poput drugih virusa s lipidnom ovojnicom, virus HIV-a je osjetljiv na detergente, sapune i izbjeljivače. U otopini može preživjeti do nekoliko dana, a u staničnoj kulturi jedan dan u stanicama, do 15 dana kao slobodan virus.

1.1.4. TREPONEMA PALLIDUM (TP)

Treponeme su vrlo tanke i dugačke spirohete. Za čovjeka je najznačajnija *Treponema Pallidum*, subsp. *pallidum* koja uzrokuje sifilis (11). U svijetu je oboljelih oko 36.4 milijuna ljudi (2008. godine), s tendencijom rasta od 10.6 milijuna novooboljelih godišnje (12).

Treponema Pallidum ima 6 - 14 uskih zavoja, zašiljene vrhove i vanjsku lipidnu ovojnicu. Genski je vrlo stabilna, što znači da ne stvara rezistenciju pa tako nije stvorila ni rezistenciju na penicilin i tetracikline. Penicilin se koristi kao lijek u liječenju sifilisa već 70 godina. Ne može se uzgojiti "in vitro", ali preživljava nekoliko dana u obogaćenoj tekućoj podlozi pod mikroaerobnim uvjetima. Može se uzgojiti u koži, testisu i u oku kunića. U krvi i plazmi može preživjeti 24 sata. Osjetljiva na isušivanje i visoku temperaturu.

Treponema Pallidum ulazi u organizam čovjeka kroz sluznice ili sitna oštećenja na koži. Lokalizacija je najčešća na spolnim organima, ali se može naći i intrarektalno, perirektalno ili oralno. Inkubacija traje od 2 do 10 tjedana. Sifilis je vrlo opasan ukoliko se javi kod trudnica (kongenitalni sifilis). Može uzrokovati smrt ploda ili značajne infekcije i malformacije. Najbolji i najdjelotvorniji lijek za liječenje sifilisa je penicilin (11).

2. CILJEVI RADA

1. Obveznim serološkim screening testiranjem na uzročnike hepatitisa B (HBV), hepatitisa C (HCV), HIV bolesti (HIV) i sifilisa (*Treponema Pallidum*) učiniti probir pozitivnih doza krvi.
2. Utvrditi i izračunati broj (postotak) lažno pozitivnih rezultata retestiranjem istim testom.
3. Utvrditi i izračunati broj (postotak) stvarno pozitivnih rezultata primjenom molekularnih metoda (Multiplex ID-NAT test).
4. Utvrditi pozitivitet na pojedine uzročnike zaraznih bolesti prenosivih krvlju primjenom diskriminacijskog testa (dHBV, dHCV, dHIV-1).
5. Isključiti privremeno ili trajno davatelje krvi iz poola dobrovoljnih davatelja krvi.
6. Obavijestiti dobrovoljnog davatelja krvi o njegovom zdravstvenom statusu s uputama za liječenje.
7. Obveznim serološkim i molekularnim metodama na uzročnike zaraznih bolesti prenosivih krvlju smanjiti rizik prijenosa uzročnika na primatelja i podići razinu kvalitete i sigurnosti transfuzijskog liječenja.

3. ISPITANICI I METODE

Istraživanje je dizajnirano kao retrospektivna studija namjernog uzorka testiranih dobrovoljnih davatelja krvi.

3.1. ISPITANICI

3.1.1. UZORCI DONACIJA DOBROVOLJNIH DAVATELJA KRVI

Ispitanici u ovom istraživanju su dobrovoljni davatelji krvi koji su zadovoljili kriterije za darivanje krvi, odnosno uzorci krvi donacija koje su dali u razdoblju od godine dana (1.10.2014. – 30.9.2015.). Dobrovoljni davatelj krvi je osoba koja daje krv bez ikakve materijalne naknade na načelima dobrovoljnosti, besplatnosti, solidarnosti i anonimnosti (8). Ponekad davatelj ne zna nosi li u sebi nekog od uzročnika zaraznih bolesti prenosivih krvlju, stoga se svaka doza krvi prije testiranja smatrana potencijalno zaraznom. Prije samog darivanja krvi, davatelj mora zadovoljiti određene kriterije. Davatelj je bio zdrav, u dobi od 18 do 65 godina, ispunio je upitnik, obavio pregled kod liječnika, a izmjereni je hemoglobin bio u granicama normale. Kvaliteta i sigurnost krvi i krvnih pripravaka ovise o pravilnoj selekciji i odabiru davatelja.

U istraživanju su korišteni rezultati obveznog, probirnog serološkog testiranja u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu KBC-a Osijek, Odjela za serološku i imunohematološku dijagnostiku davatelja krvi na HBV, HCV, HIV i sifilis kao i rezultati potvrđenih testova, rezultati probirnih molekularnih testova (ID-NAT), potvrđenih i diskriminacijskih molekularnih testova dobivenih testiranjem u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, Petrova 3, Zagreb. Uzorci donacija odnosno ispitanici koji su sudjelovali u ovom istraživanju dolaze s područja pet županija: Osječko-baranjske, Vukovarsko-srijemske, Virovitičko-podravske, Požeško-slavonske i Brodsko-posavske.

Za serološku dijagnostiku zaraznih bolesti prenosivih krvlju korišten je serumski uzorak, a za molekularnu dijagnostiku krvna plazma.

3.2. METODE

Obvezna testiranja uzoraka donacija krvi temeljena su na serološkim i molekularnim testiranjima.

Obvezna serološka dijagnostika zaraznih bolesti prenosivih krvlju temeljena je na probirnom testiranju pomoću enzimskih imunotestova na uzročnike hepatitisa B (HBV), hepatitisa C (HCV), HIV bolesti (HIV) i sifilisa (*Treponemu Pallidum*).

Obvezna molekularna dijagnostika zaraznih bolesti prenosivih krvlju temeljena je na otkrivanju HBV DNK, HCV RNK i HIV1 RNK pomoću Multiplex ID-NAT testa (Procleix Ultrio Plus Assay, Procleix TIGRIS system) testiranjem svakog uzorka donacije pojedinačno.

Preporuke i načela serološkog i molekularnog testiranja propisane su Europskim direktorijem za kvalitetu u medicini i zdravstvu, Preporukama za pripremu, uporabu i osiguranje kvalitete krvnih pripravaka (17. izdanje), 9. Poglavlje, pod nazivom Načela probirnog testiranja biljega zaraznih bolesti (13).

Vrlo važne značajke testova su osjetljivost i specifičnost i bit će navedene pojedinačno prema testovima.

Osjetljivost testa = broj stvarno pozitivnih nalaza/ukupan broj bolesnika,

= stvarno pozitivni/ (stvarno pozitivni + lažno negativni).

Specifičnost testa = broj stvarno negativnih nalaza/ukupan broj zdravih,

= broj stvarno negativnih nalaza/ (stvarno negativni + lažno pozitivni).

3.2.1. SEROLOŠKA TESTIRANJA

Obvezna serološka testiranja uzoraka krvi davatelja, prema Zakonu o krvi i krvnim pripravcima, obuhvatila su testiranje na hepatitis B "surface" antigen (HBsAg), antitijela na strukturalne i nestrukturalne virusne antigene hepatitisa C (anti-HCV), HIV 1(0)/2 antitijela i HIV1p24 antigen kombiniranim HIVAg/At testom te dokazivanje specifičnih antitijela na *Treponemu Pallidum* (anti-TP) uzročnika sifilisa (1). Navedena serološka testiranja služila su u svrhu probira. Najvažnija karakteristika probira je njegova visoka osjetljivost koja je poslužila

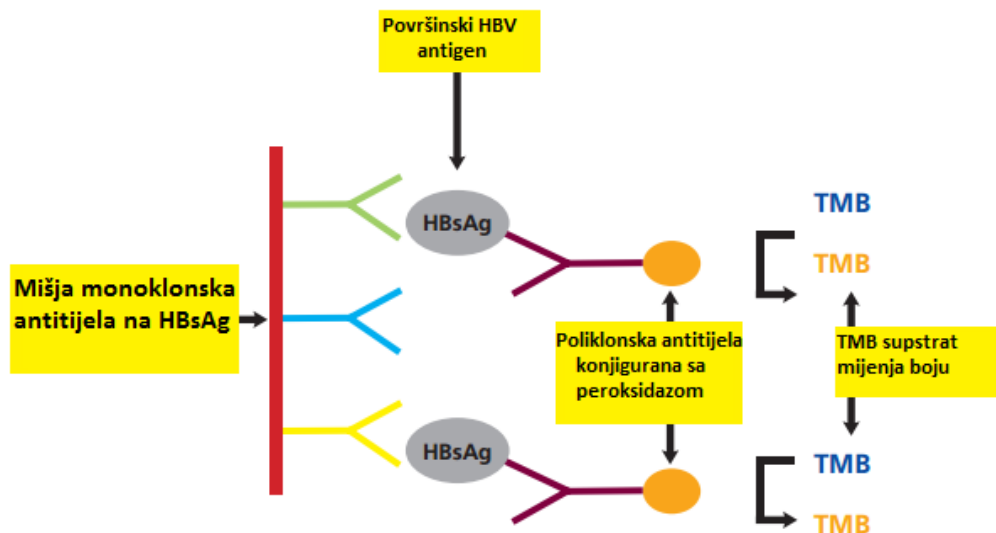
u izdvajanju pozitivnih i suspektih donacija krvi. Svi serološki testovi temeljeni su na imunokemijskim reakcijama antigena i protutijela. Uzorak za testiranje bio je serum.

3.2.1.1. HBsAg

Probirno je serološko testiranje na HBsAg obavljeno pomoću tri platforme testova:

1. HBsAg 3.0 Murex, DiaSorin; (osjetljivost 100 %, specifičnost 99,97 %) (14)
2. Enzygnost HBsAg 6.0, Siemens (osjetljivost 100 %, specifičnost 99,92 %) (15)
3. Monolisa HBsAg Ultra, Bio-Rad (osjetljivost 100 %, specifičnost 99,28 %) (16)

Princip testa temelji se na vezi između mješavine mišjih monoklonalnih protutijela protiv HBsAg-a kojima su obložene testne jažice i HBsAg-a koji se nalazi u uzorku. Na novonastali spoj Ag/At vezala su se poliklonalna protutijela koja su obilježena peroksidaza enzimom. Dodavanjem TMB supstrata aktiviran je enzim i razvila se boja. Reakcija je zaustavljena dodavanjem sumporne kiseline. Intenzitet obojenja upravo je proporcionalan koncentraciji HBsAg-a u uzorku.



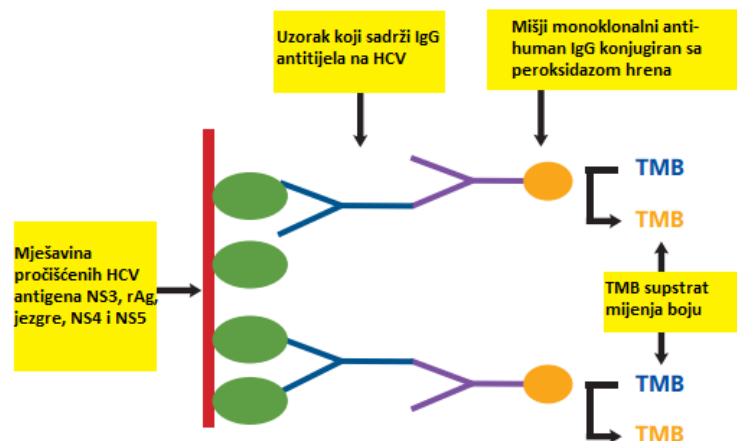
Slika 1. Princip HBsAg testa

3.2.1.2. ANTI-HCV

Probirno je serološko testiranje na anti-HCV obavljeno pomoću tri platforme testova:

1. anti-HCV 4.0, Murex, Diasorin (osjetljivost 100 %, specifičnost 99,88 %) (17)
2. Enzygnost anti-HCV 4.0, Siemens (osjetljivost 100 %, specifičnost 99,8 %) (18)
3. Monolisa anti-HCV verzija 3, Bio-Rad (osjetljivost 100 %, specifičnost 100 %) (19)

Princip testa temelji se na vezi pročišćene mješavine HCV antigena (NS3 rAg, core, NS4 i NS5) vezanih na jažice i anti-HCV-a koji se nalazi u uzorku. Na novonastali spoj vezalo se protutijelo obilježeno enzimom (mišja monoklonalna anti-humana IgG protutijela obilježena peroksidazom hrena). Dodavanjem TMB (tetrametilbenzidin) supstrata aktiviran je enzim. Reakcija je zaustavljena dodavanjem sumporne kiseline. Intenzitet obojenja upravo je proporcionalan koncentraciji anti-HCV-a u uzorku.



Slika 2. Princip anti-HCV testa

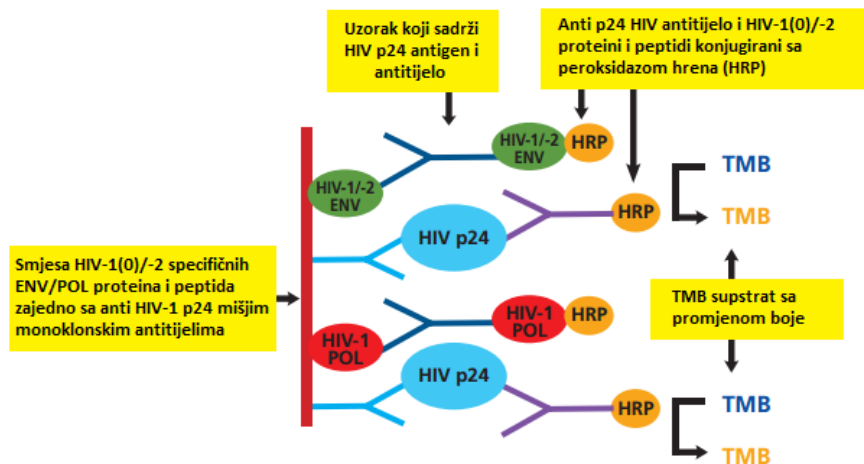
3.2.1.3. HIV AG/AT

Probirno je serološko testiranje na HIV Ag/At-a obavljeno pomoću tri platforme testova:

1. HIV Ag/Ab combination, Murex, Diasorin (osjetljivost 100 %, specifičnost 99,78 %) (20)
2. Enzygnost HIV Integral 4, Siemens (osjetljivost 100 %, specifičnost 99,95 %) (21)
3. GenScreen HIV Ag/Ab, Bio-Rad (osjetljivost 100 %, specifičnost 99,95 %) (22)

Princip testa temelji se na vezi mješavine HIV-1 (0)/-2 specifičnih ENV/POL proteina i peptida s protutijelima anti HIV-1 (0)/-2 te mišjih monoklonalnih anti HIV-1 p24 protutijela s HIV-1 p24 antigenom ukoliko se nalaze u uzorku. Anti-p24 HIV protutijela i HIV-1(O)/-2 proteini i peptidi konjugiraju se s peroksidazom hrena (HRP). Dodavanjem TMB-a aktiviran je enzim koji je dao obojenje. Reakcija je zaustavljena dodavanjem sumporne kiseline.

Intenzitet obojenja upravo je proporcionalan koncentraciji HIV Ag-a ili HIV At-a u uzorku.



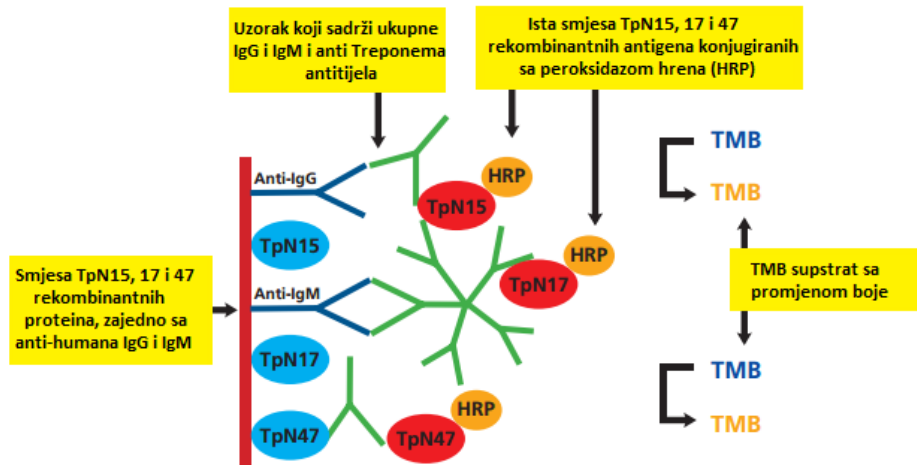
Slika 3. Princip testa HIV Ag/At

3.2.1.4. ANTI-TP

Probirno je serološko testiranje na anti-TP obavljeno pomoću tri platforme testova:

1. ICE Syphilis, Murex, Diasorin (osjetljivost 100 %, specifičnost 99,95 %) (23)
2. Enzygnost Syphilis, Siemens (osjetljivost 98,4 – 100 %, specifičnost 100 %) (24)
3. Monolisa Syphilis Total Ab, Bio-Rad (osjetljivost 99,56 %, specifičnost 100 %) (25)

Princip testa temelji se na vezi mješavine rekombinantnih proteina TnP 15, TnP 17 i TnP 47, zajedno s anti-IgG i anti-IgM protutijelima na *Treponemu Pallidumu* kojima su obložene jažice sa specifičnim protutijelima s odgovarajućim proteinima koja se nalaze u uzorku. Proteini iz uzorka se zatim konjugiraju peroksidazom hrena. Dodavanjem TMB supstrata aktivirao se enzim koji je dao obojenje. Reakcija je zaustavljena dodavanjem sumporne kiseline. Intenzitet obojenja upravo je proporcionalan koncentraciji anti-TP-a u uzorku.



Slika 4. Princip anti-TP testa

3.2.1.5. INTERPRETACIJA REZULTATA SEROLOŠKIH PROBIRNIH TESTOVA

Interpretacija rezultata seroloških probirnih testova temeljena je na usporedbi optičke gustoće uzorka i granične vrijednosti (cut-off-a). Reaktivni su bili svi rezultati iznad, a negativni ispod granične vrijednosti. Nakon inicijalnog reaktivnog ili suspektog rezultata, uzorak krvi DDK-a je retestiran u duplikatu istim testom, a donacija je fizički izdvojena u karantenu do konačne evaluacije. Uzorci koji su bili reaktivni u najmanje jednom od dvaju ponovljenih testiranja, proglašeni su ponovljeno reaktivnima. Zaključak je bio da sadrže određeni antigen odnosno protutijelo. Uzorak krvi donacije poslan je na potvrdno serološko testiranje u Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Petrova 3, Zagreb uz pravilno ispunjen Nalog za potvrdno testiranje.

3.2.1.6. POTVRDNI SEROLOŠKI TESTOVI

Potvrdne serološke testove obavlja Referentni centar Ministarstva zdravlja Republike Hrvatske, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu (HZTM), Petrova 3, Zagreb.

Potvrdno serološko testiranje kod pozitivnog HBsAg probirnog testa obuhvatilo je EIA testiranja na HBsAg različitih proizvođača, test kvantifikacije uzročnika te kompletne HBV markere.

Potvrдно serološko testiranje na HCV uz anti-HCV EIA test drugog proizvođača te kombinirani HCV Ag/Ab test uključivalo je INNO-LIA HCV score potvrdni test ili RecomLine HCV IgG potvrdni test.

Potvrдно serološko testiranje na HIV uz anti-HIV EIA test i kombinirani HIV Ag/Ab EIA test drugog proizvođača uključivalo je INNO-LIA HIV ½ score potvrdni test ili RecomLine HIV1&HIV2 IgG potvrdni test. Uz njih se radi i HIV1 p24 test.

Potvrдно serološko testiranje na sifilis (*Treponemu Pallidum*) uz anti-TP EIA test jednog ili više proizvođača uključivalo je i INNO-LIA Syphilis Score potvrdni test ili RecomLine *Treponema* IgG potvrdni test. Uz njih su rađeni RPR sifilis test (rapid plasma reagin) te TPHA kvantitativni test (*Treponema Pallidum* hemaglutinacijski test - kvantitativni) (1).

INNO-LIA i RecomLine testovi temeljeni su na principu enzimskog imunotesta.

Interpretacija rezultata seroloških potvrdnih testova odvijala se prema Algoritmu NAT probiranja i potvrdnog testiranja DDK-a na HBV, HCV i HIV-1 (testiranje na pojedinačnoj donaciji) (1).

3.3. MOLEKULARNA TESTIRANJA

3.3.1. ID-NAT TEST

Klinički zavod za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek, Odjel serološke i imunoematološke dijagnostike davatelja krvi, svakodnevno je slao uzorke krvi davatelja na probirno molekularno testiranje ID-NAT (Individual donor nucleic acid testing) u Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Petrova 3, Zagreb. Uzorci krvi su uzeti uz dodatak antikoagulansa EDTA. ID-NAT je obavljen pomoću Procleix Ultrio Plus testa. Test je temeljen na principu transkripcijski posredovane amplifikacije (TMA), na aparaturi Procleix TIGRIS System. Procedura testa uključivala je tri glavna koraka koja su se odvijala u jednoj tubi, priprema uzorka; ciljna amplifikacija HIV-1 RNK, HCV RNK i HBV DNK TMA metodom i detekcija amplikona. Za vrijeme pripreme uzorka, virusne RNK i DNK su izolirane iz uzorka pomoću detergenta koji je rastopio virusne ovojnice, denaturirao proteine i oslobodio virusne genomske RNK i/ili DNK. Ako su u uzorku bili prisutni oligonukleotidi homologni visoko

konzerviranim regijama HIV-1, HCV i HBV, ciljano su se hibridizirali u HIV-1 RNK, HCV RNK i HBV DNK. Nakon dodavanja reagensa za ciljno pojačavanje hibridizirane mete su bile uhvaćene na magnetske mikročestice koje su izdvojene iz uzorka uz pomoć magnetskog polja. Pranjem su odstranjene strane čestice iz reakcijske tube. Detekcija je postignuta korištenjem jednolančanih proba nukleinskih kiselina s kemiluminiscentnim oznakama koje su komplementarne amplikonu. Selektivni reagens je razlikovao hibridizirane od nehibridiziranih proba (primera) inaktivirajući oznake na nehibridiziranim probama. Detektirani kemiluminiscentni signal proizveden iz hibridiziranih proba, mjeren je u luminometru i izražen u relativnim svjetlosnim jedinicama (RLU). Interna je kontrola bila dodana u svaki testni uzorak, kontrolu ili testnu kalibracijsku tubu u svrhu kontrole amplifikacijskih i detekcijskih koraka.

3.3.2. DISKRIMINACIJSKI TESTOVI

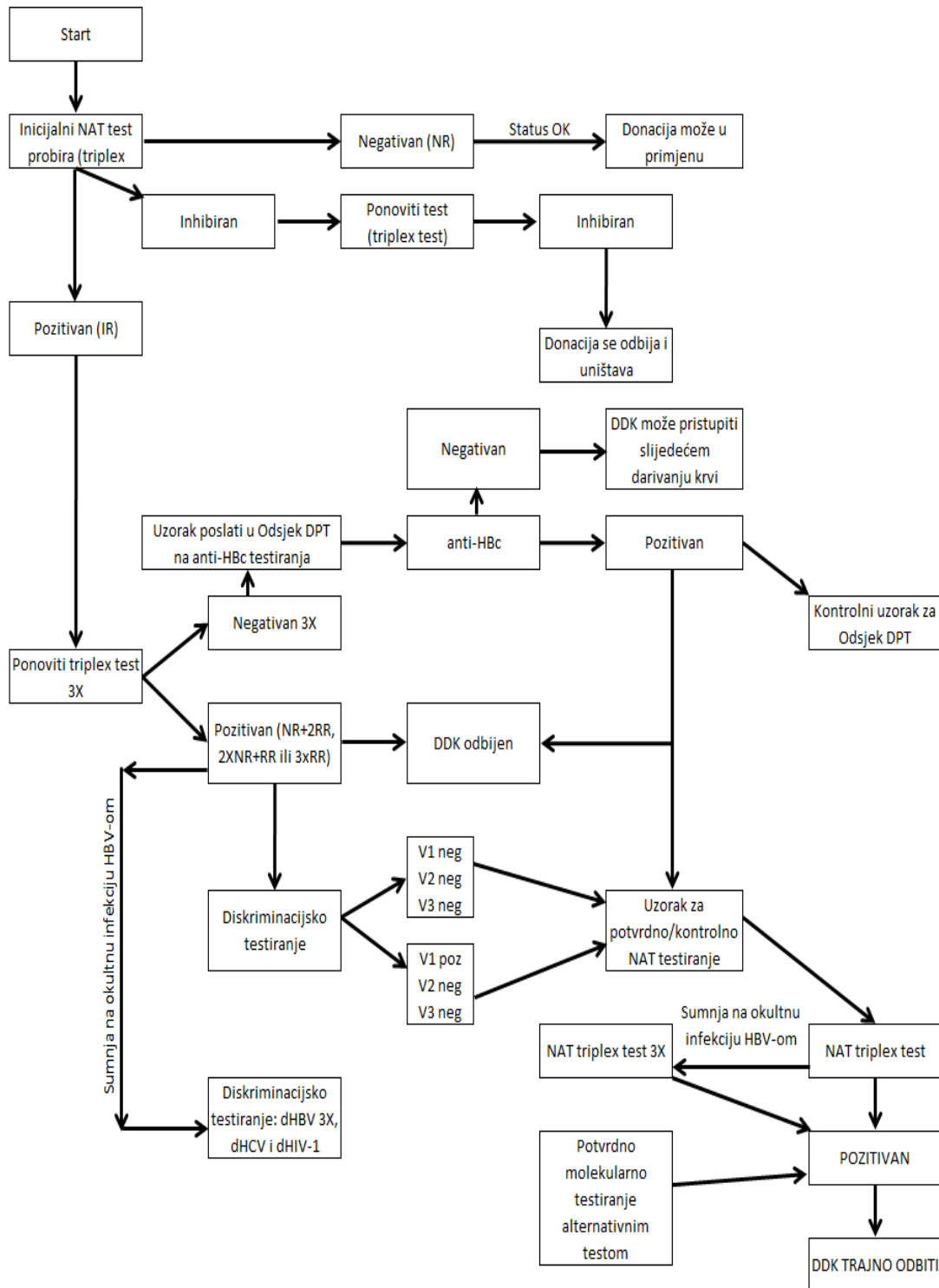
Svi uzorci koji su bili reaktivni na ID-NAT test testirani su diskriminacijskim testovima (dHBV, dHIV-1 i dHCV). Diskriminacijski se test također sastojao od tri koraka kao i ID-NAT test, s jednom razlikom. Umjesto reagensa Procleix Ultrio Plus testa korišteni su HIV-1 specifični, HCV-specifični ili HBV-specifični probni reagensi (26).

Interpretacija rezultata obavlja se prema Algoritmu NAT probiranja i potvrdnog testiranja DDK-a na HBV, HCV i HIV-1 (testiranje na pojedinačnoj donaciji) propisanog od HZTM-a (1).

3.4. EVALUACIJA DOZA I DAVATELJA KRVI PREMA REZULTATIMA ID-NAT-a I SEROLOŠKIH TESTOVA

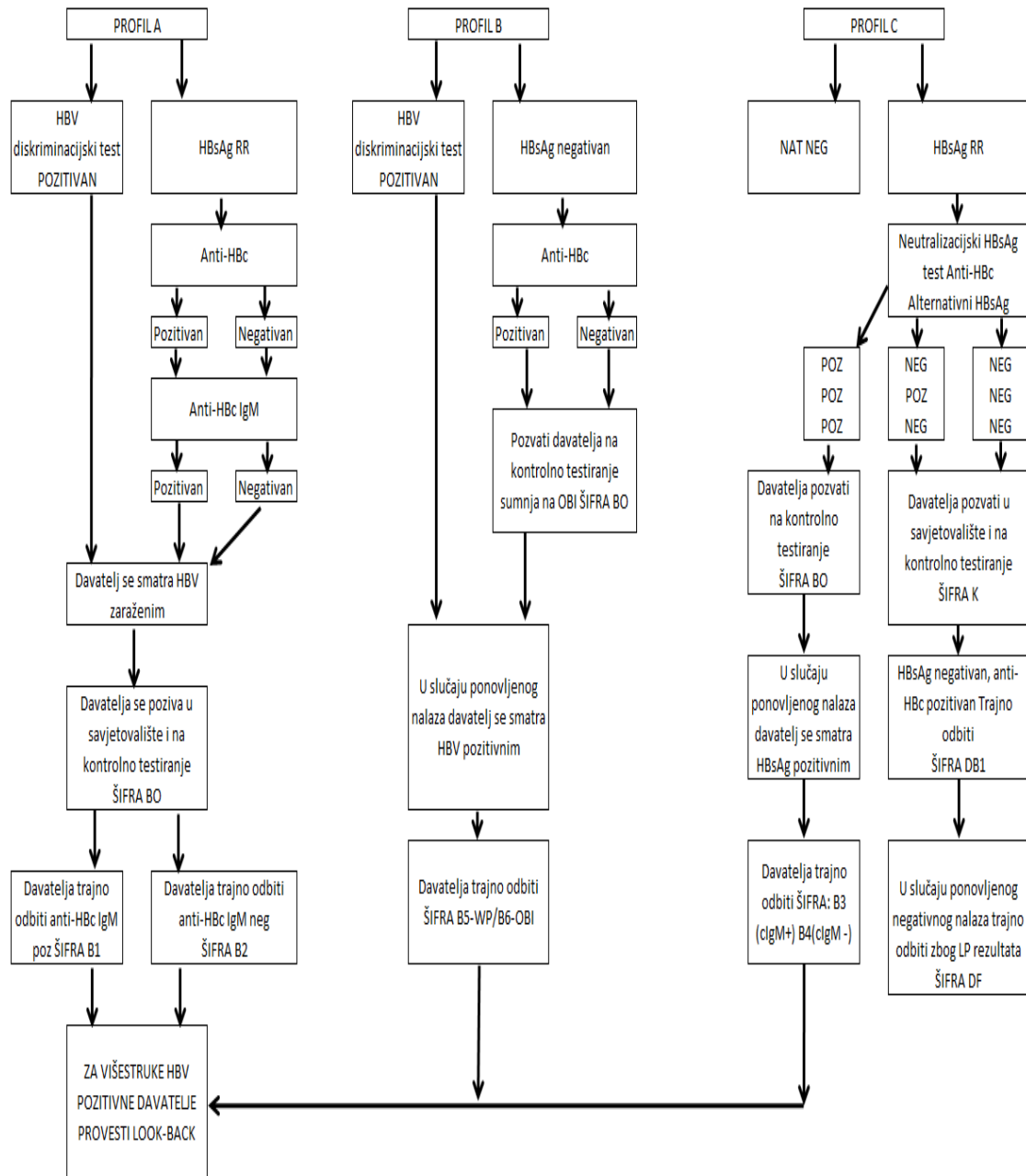
Evaluacija doza i rezultata radi se uz pomoć sljedećih algoritama propisanih od HZTM-a:

- Algoritam evaluacije davatelja s reaktivnošću HBV-NAT i/ili HBsAg testa (1)
- Algoritam evaluacije davatelja s reaktivnošću HIV-dNAT i/ili HIV Ag/Ab testa (1)
- Algoritam evaluacije davatelja s reaktivnošću HCV-NAT i/ili anti HCV testa (1)
- Algoritam evaluacije davatelja krvi s reaktivnošću u sifilis treponemskom testu (1)

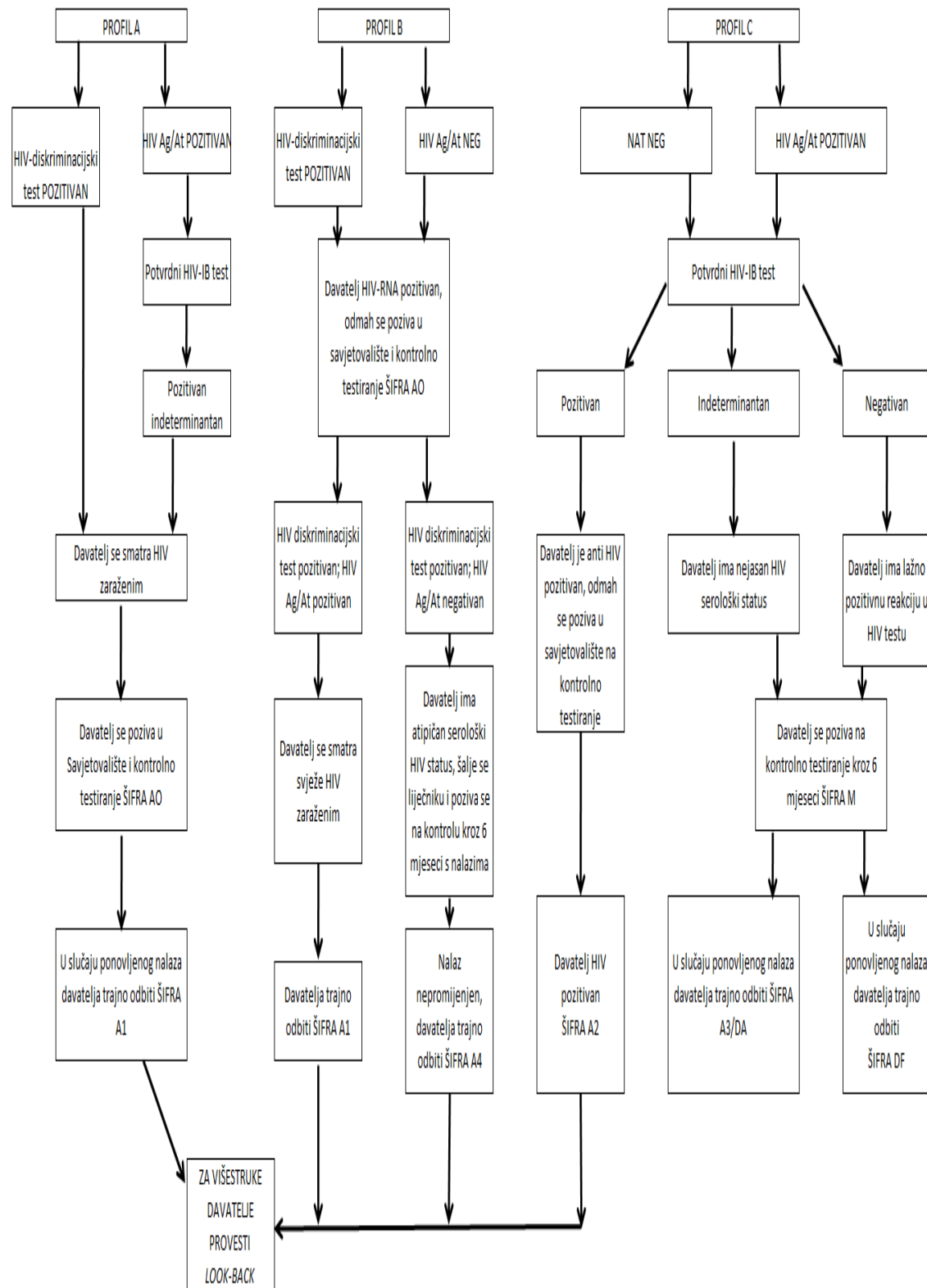


Slika 5. Algoritam NAT probiranja i potvrdnog testiranja DDK-a na HBV, HCV i HIV-1 (testiranje na pojedinačnoj donaciji (1))

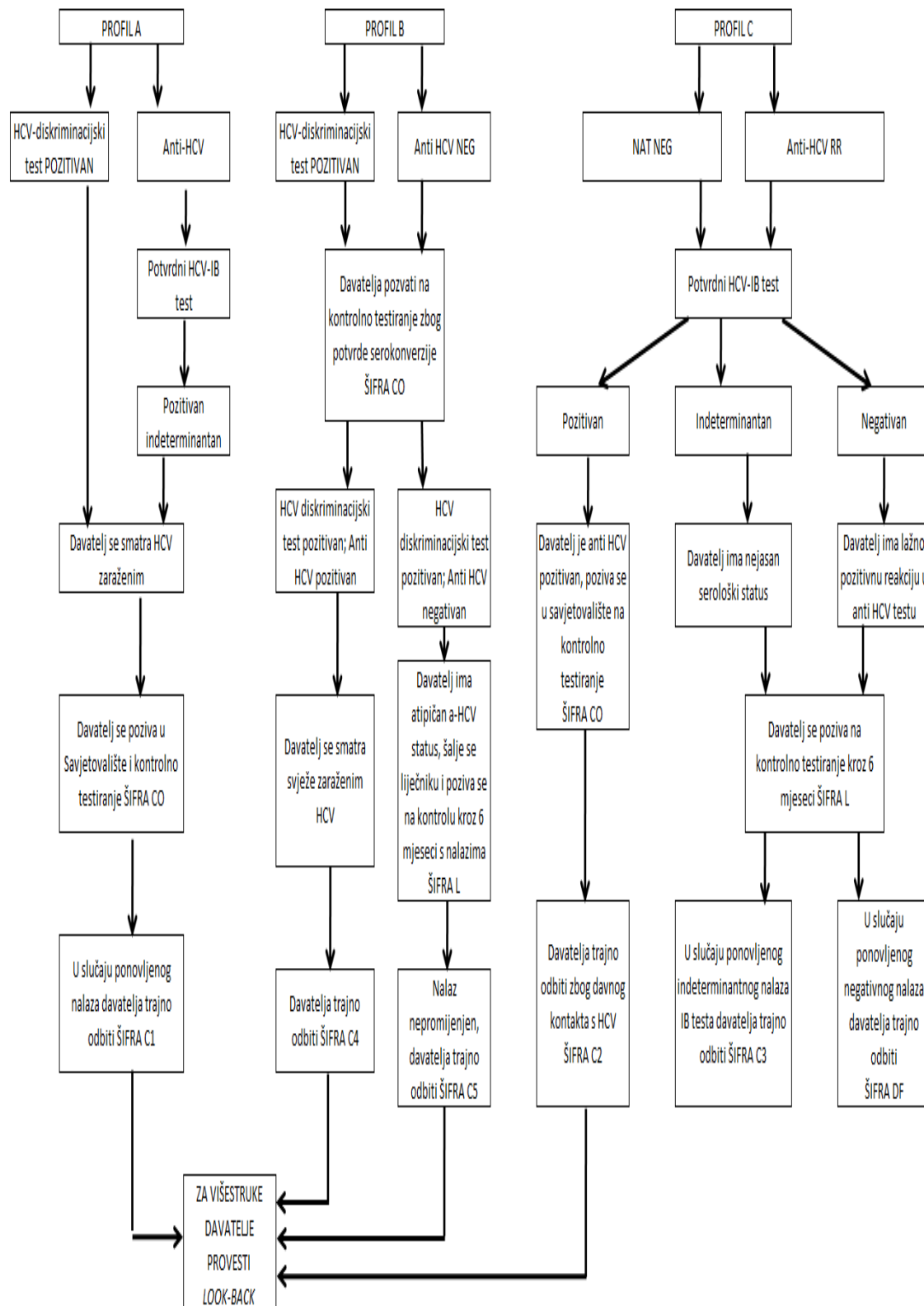
3.4.1. ALGORITMI EVALUACIJE DAVATELJA



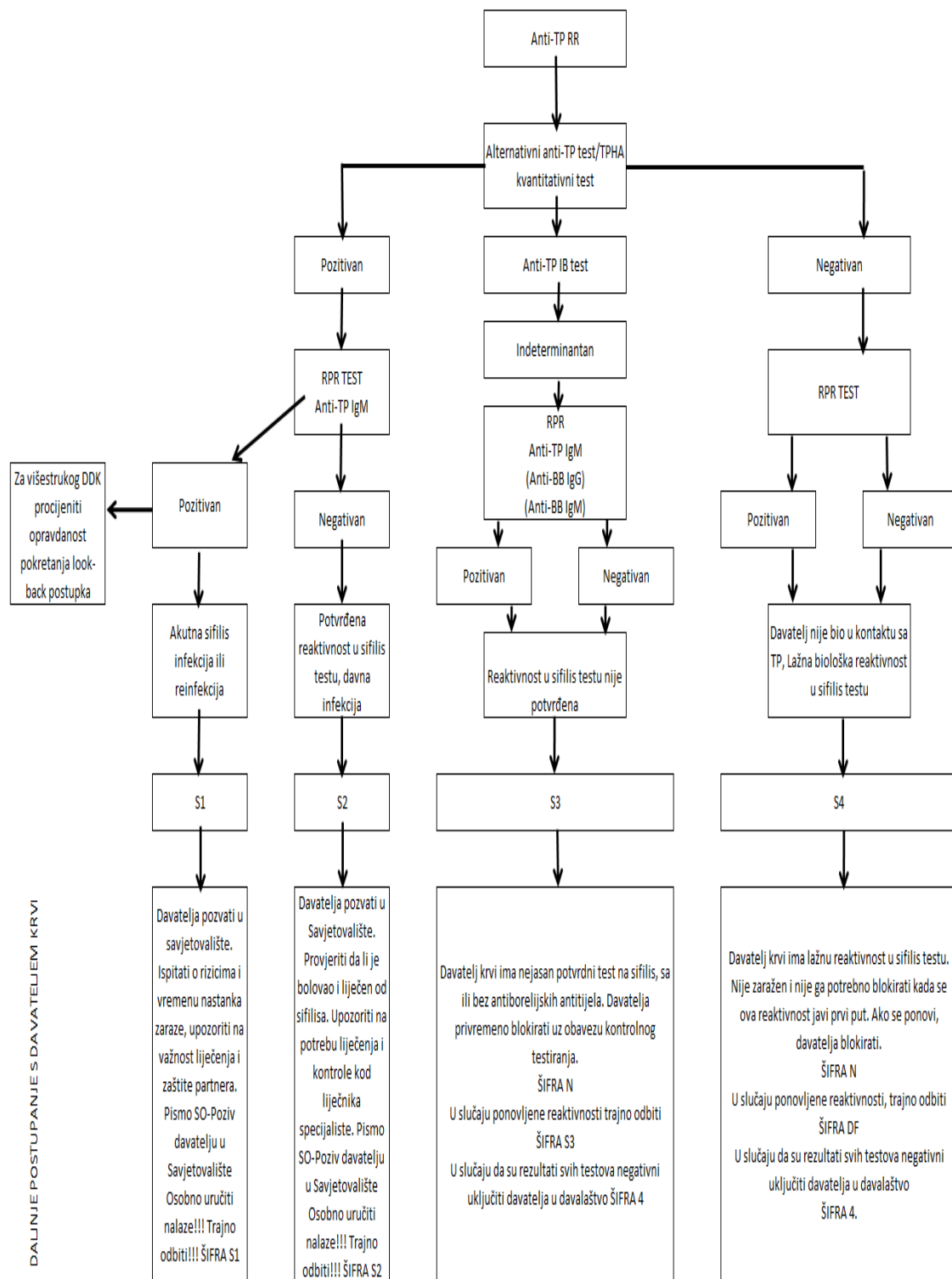
Slika 6. Algoritam evaluacije davatelja s reaktivnošću HBV-NAT i/ili HBsAg testa (1)



Slika 7. Algoritam evaluacije davatelja s reaktivnošću HIV-dNAT i/ili HIV Ag/Ab testa (1)



Slika 8. Algoritam evaluacije davatelja s reaktivnošću HCV-NAT i/ili anti-HCV testa (1)



Slika 9. Algoritam evaluacije davatelja krvi s reaktivnošću u sifilis treponemskom testu (1)

Evaluacija donacija radi se prema uputama HZTM-a (za sve transfuzije u RH) (Tablica 1).

Tablica 1. Postupanje s dozama krvi temeljem rezultata ID-NAT-a i seroloških testova (1)

| Probirni test | Rezultati testiranja | | | | |
|-------------------------|----------------------|---------------------|------------------|------------------|------------------|
| ID-NAT | NN | NN | IR | IR | NN |
| Serološki | NN | RN | NN | RR | RR |
| Postupanje s dozom krvi | Doza se može izdati | Doza se može izdati | Doza se uništava | Doza se uništava | Doza se uništava |

3.5. "WINDOW PERIOD" (WP) ILI "DIJAGNOSTIČKI PROZOR"

Usprkos svim postupcima koji se poduzimaju, uvijek postoji mogućnost prijenosa zaraznih bolesti. Prijenos uzročnika zaraznih bolesti transfuzijom je moguć u vrijeme "window period-a". WP je vrijeme od infekcije do pozitivnog rezultata testa pretraživanjem. Različit je za serološka i molekularna testiranja (1).

Razlika u trajanju WP-a vidljiva je iz Tablice 2 (prema HZTM-u za sve transfuzijske službe u RH).

Tablica 2. Prosječne vrijednosti WP-a za testove koji se koriste u ispitivanju davatelja krvi u HZTM-u (1)

| Test: | Prosjek WP u danima | Osjetljivost IU/mL |
|----------------------------------|---------------------|--------------------|
| Triplex ID-NAT Grifols HIV-1 RNA | 5-6 | 18,2-25,7 |
| HCV RNA | 3-4 | 4,5-6,7 |
| HBV DNA | 15 | 3,0-4,1 |
| HBsAg | 38 | <0,13 |
| Anti-HCV | 60 | |
| HIV Ag/At | 16 | |
| Anti-TP | 21 | |

3.6. PROFILI DDK-a

Profili se davatelja određuju nakon dobivanja kompletnih rezultata testiranja prema HZTM-u za sve transfuzijske službe u RH (1).

Profil A obuhvaća sve zaražene DDK kod kojih je potvrdnim testom dokazan virusni genom i serološki biljeg infekcije. Za hepatitis B virusnu infekciju: HBV-DNK/HBsAg, za hepatitis C virusnu infekciju: HCV-RNK/anti-HCV te za HIV 1 infekciju: HIV1 RNK/anti-HIV1 ili anti-HIV2/HIV p24 Ag. Davatelje se poziva na kontrolno testiranje i savjetovanje da bi bila isključena moguća zamjena uzorka te kako bi dobili potrebne informacije o svom statusu. Ujedno se davatelje informira o ponašanju u odnosu na svoju okolinu te o mogućnostima liječenja. DDK s profilom A su trajno odbijeni za sljedeća davanja krvi.

Profil B odgovara davateljima krvi koji se nalaze u ranoj fazi infekcije („window period“) ili imaju okultnu hepatitis B virusnu infekciju (OBI). Oni se također pozivaju na kontrolno testiranje kako bi se potvrdio nalaz molekularnog testa koji će nam dati informaciju radi li se o akutnoj infekciji ili kroničnoj okultnoj infekciji. Davatelji tog profila kod kojih je molekularni test u kontrolnom uzorku pozitivan, također se trajno odbijaju za davanje krvi.

Profil C ima različito značenje za različite virusne infekcije i ishode kontrolnih testiranja. Davatelji krvi s negativnim rezultatom ID-NAT testa u kontrolnom uzorku koji imaju ponovljeno reaktivan rezultat serološkog testa, a rezultat potvrdnog serološkog testa je negativan ili nejasan, smatraju se nezaraženima. Reaktivnost se smatra lažnom biološkom reaktivnošću, ali se oni ipak trajno odbijaju za davanja krvi.

Tumačenje takvih rezultata različito je prema vrsti infekcije:

Profil C kod HIV-infekcije odgovara zaraženoj osobi pod antiretrovirusnom terapijom zbog čega virus nije dokaziv u krvi ili se radi o infekciji virusnom varijantom koju odabrani molekularni test ne može dokazati pa je u uzorku moguće dokazati samo HIV protutijela i antigen. U slučaju HBV-infekcije, profil C odgovara osobama koje su nositelji HBsAg-a čiji pozitivan rezultat anti-HBc testa govori da se radi o prisutnosti virusa u stanicama jetre, hepatocitima. Virus se nalazi u obliku kružne zatvorene kovalentne DNA (cccDNA), dok se istovremeno ne može dokazati u krvi bilo iz razloga što ga nema ili se nalazi u koncentracijama koje su ispod praga detekcije molekularnog testa i koji iz tih razloga ne može dokazati njegovu prisutnost.

U slučaju HCV-infekcije, profil C se odnosi na osobe koje su imale kontakt s virusom hepatitisa C i koje su ga uspjele eliminirati ili s osobama s intermitentnom HCV viremijom.

Davatelji krvi čiji je rezultat ID-NAT testa negativan s potvrđeno pozitivnim ponovljenim rezultatom serološkog testa i u kontrolnom uzorku, također se trajno odbijaju.

Tablica 3. Tumačenje rezultata NAT i HBsAg testa (prema HZTM-u za sve transfuzije u RH)

(1)

| Potvrđni test: | Profil A | Profil B | Profil C |
|--------------------------------------|--|--|---|
| HBV-DNA | Pozitivan | Pozitivan | Negativan |
| HBsAg potvrđni test (neutralizacija) | Pozitivan (Radi se po potrebi) | Ne radi se | Pozitivan ili Negativan |
| Anti-HBc test | Negativan ili pozitivan | Negativan ili pozitivan | Negativan ili pozitivan |
| Alternativni HBsAg test | Pozitivan | Negativan | Negativan ili pozitivan |
| Tumačenje: | Dokazana je zaraza HBV. | Dokazana je zaraza HBV | Ako je alternativni HBsAg test pozitivan i anti-HBc pozitivan, radi se o nosilaštvu HBsAg. Virus je u jetri i moguća je intermitentna viremija. Davatelj je potencijalno zarazan i označava se šiframa: B3 - kada je anti-HBC IgM pozitivan i B4 - kada je anti HBc IgM negativan |
| | Šifra: B1 Akutna anti-HBc IgM pozitivan | Šifra: B5 HBV WP infekcija | |
| | Šifra: B2 Kronična anti-HBc IgM negativan | Šifra: B6 (OBI) Okultna HBV infekcija | Ako je alternativni HBsAg test negativan i anti-HBc test negativan sumnja se na lažno pozitivan HBsAg test; Šifra: K/DF |

Tablica 4. Tumačenje rezultata NAT-a i anti-HCV testa (prema HZTM-u za sve transfuzije u RH) (1)

| Potvrđni test | Profil A | Profil B | Profil C |
|------------------|--|--|--|
| HCV-RNA | Pozitivan | Pozitivan | Negativan |
| Anti-HCV IB test | Pozitivan | Negativan | Pozitivan |
| Tumačenje: | Šifra: C1 Dokazana zaraza virusom hepatitisa C | Šifra C1/C4 i Šifra C5: Zaraza virusom hepatitisa C u WP | Šifra: C2 - Razriješena zaraza virusom HC. Moguća je intermitentna viremija. Davatelj potencijalno zarazan |
| | | | Šifra: C3 - nejasan potvrđni IB test |
| | | | Šifra: L/DF - negativan potvrđni IB test, lažno pozitivan serološki test |

Tablica 5. Tumačenje rezultata NAT-a i HIV Ag/Ab testa (prema HZTM-u za sve transfuzije u RH) (1)

| Potvrđni test | Profil A | Profil B | Profil C |
|----------------------|--|---------------------------------------|---|
| NAT-HIV1-RNA | Pozitivan | Pozitivan | Negativan |
| HIV1,2 Ag/At IB test | Pozitivan | Negativan | Pozitivan/indeterminantan/negativan |
| Tumačenje: | Šifra: A1 Dokazana zaraza HIV- om | Šifra: A1/A4 Zaraza HIV-om u WP | Šifra:A2 IB pozitivan: dokazana zaraza HIV-om. Moguća virusna varijanta ili HIV- 2 infekcija ili je davatelj pod HAART terapijom |
| | | | Šifra: M/A3 IB indeterminantan test |
| | | | Šifra: M/DF IB Negativan potvrđni lažno pozitivan serološki test |

3.7. ISKLJUČIVANJE I OBAVJEŠTAVANJE DOBROVOLJNOG DAVATELJA

Svaka je donacija koja je prema algoritmu serološkog i molekularnog testiranja uzoraka krvi proglašena pozitivnom na neki od uzročnika krvlju prenosivih bolesti, upisom je rezultata u "e-Delphyn" i validacijom istog, proglašena pozitivnom te joj se automatski pridružuje oznaka "odbijeno". Takva donacija je izdvojena, označena nesukladnom i poslana na uništavanje infektivnog otpada, koje je propisano Zakonom o održivom gospodarenju otpadom i Pravilnikom o vrstama otpada. Redoslijed postupaka s nesukladnom, infektivnom donacijom ima svoj pisani trag.

Nakon isključivanja donacije krvi, dobrovoljnog davatelja krvi smo obavijestili o spoznajama važnim za njegovo zdravlje. Uobičajenim načinom, pismom, davatelj je upućen na postupke koje je potrebno učiniti ili je pozvan na savjetovanje o zdravlju. Pismo u kojem je davatelj obavješten o dokazanoj prisutnosti uzročnika krvlju prenosivih bolesti, uručeno je davatelju osobno u savjetovalištu. Na osnovi važećih zakona RH, u sklopu "e-Delphyn-a" nalazi se zbirka pisama davateljima krvi prema kojoj je svakom davatelju, na osnovu rezultata testiranja, poslano odgovarajuće pismo.

Svako pismo daje informacije DDK-u što se od njega zahtjeva, procjenu nužnosti postupanja prema primljenoj obavijesti, upućuje ga na osobu u transfuzijskoj ustanovi koja je pismo poslala i mogućnost kontakta (radno vrijeme, broj telefona i adresu). Svako pismo je potpisano od odgovorne osobe, sadržava žig ustanove, pravovremeno je poslano, točno adresirano i slanje pisma je evidentirano. Pisma koja su imala oznaku "URUČITI OSOBNO" nisu poslana poštom, već su se osobno uručila davatelju. Slanje pisma poštom može ići isključivo na zahtjev davatelja. Cijeli je postupak odrađen prema preporukama u Zbirci pisama davateljima krvi sadržane u "*e-Delphyn*" računalnom programu za rad u transfuzijskoj djelatnosti (27).

Tablica 6. Popis pisama e-Delphyn programa s pripadajućim brojem obrasca i načinom uručivanja (prema HZTM-u za sve transfuzijske službe u RH) (1)

| Šifra pisma | Pisma prema rezultatima NAT i seroloških testova | Način | Obrazac |
|-------------|---|----------------|---------|
| | HBV | | |
| B1 | TRAJNO ODBIJEN ZBOG AKUTNE HBV INFEKCIJE HBV-DNA pozitivan/HBsAg pozitivan/antiHbc IgM pozitivan | Uručiti osobno | OB-705 |
| B2 | TRAJNO ODBIJEN ZBOG KRONIČNE HBV INFEKCIJE HBV-DNA pozitivan/HBsAg pozitivan/anti-HBc IgM negativan | Uručiti osobno | OB-425 |
| B3/B4 | TRAJNO ODBIJEN ZBOG NOSILAŠTVA HBsAg HBV-DNA negativan/HBsAg pozitivan/anti-HBc pozitivan | Uručiti osobno | OB-686 |
| B5 | TRAJNO ODBIJEN ZBOG HBV INFEKCIJE U WINDOW PERIODU HBV-DNA pozitivan/HBsAg negativan/anti-HBc negativan | Uručiti osobno | OB-234 |
| B6 | TRAJNO ODBIJEN ZBOG OKULTNE HBV INFEKCIJE (OBI) HBV-DNA pozitivan/HBsAg negativan/anti-HBc pozitivan | Poštom | OB-236 |
| DB | TRAJNO ODBIJEN ZBOG ATIPIČNOG HBV PROFILA HBV-DNA negativan/HBsAg pozitivan/anti-HBc negativan | Poštom | OB-232 |
| DB1 | TRAJNO ODBIJEN ZBOG DAVNOG KONTAKTA S HBV HBV-DNA i HBsAg negativan/anti-HBc pozitivan/otkrije se slučajno kroz trace- back ili testiranjem davatelja na anti-HBc | Poštom | OB-430 |
| K | PRIVREMENA ZABRANA DAVALJA KRV POZIV NA KONTROLNO TESTIRANJE ZBOG NEPOTVRĐENE HBsAg REAKTIVNOSTI | Poštom | OB-429 |
| | HCV | | |
| Šifra pisma | Pisma prema rezultatima NAT i seroloških testova | Način | Obrazac |
| | HCV | | |
| C1 | TRAJNO ODBIJEN ZBOG INFEKCIJE VIRUSOM HEPATITISA C HCV-RNA i anti-HCV potvrđeno pozitivan | Uručiti osobno | OB-426 |
| C2 | TRAJNO ODBIJEN ZBOG DAVNOG KONTAKTA S HCV HCV-RNA negativan/anti-HCV potvrđeno pozitivan | Uručiti osobno | OB-240 |
| C3 | TRAJNO ODBIJEN ZBOG NEJASNOG anti-HCV POTVRĐENOG TESTA HCV-RNA negativan/anti-HCV IB indeterminantan | Poštom | OB-428 |
| C4 | TRAJNO ODBIJEN ZBOG HCV INFEKCIJE U "WINDOW PERIODU" HCV-RNA pozitivan/anti-HCV negativan (izostanak serokonverzije) | Uručiti osobno | OB-264 |
| C5 | TRAJNO ODBIJEN ZBOG OKULTNE HCV INFEKCIJE HCV-RNA pozitivan/bez naknadne anti-HCV serokonverzije (anti- HCV u kontrolnom uzorku negativan) | Uručiti osobno | OB-241 |
| L | PRIVREMENA ZABRANA DAVANJA KRV POZIV NA KONTROLNO TESTIRANJE ZBOG NEPOTVRĐENE anti-HCV REAKTIVNOSTI | Poštom | OB-683 |

3. Ispitanici i metode

| Šifra pisma | Pisma prema rezultatima NAT i seroloških testova | Način | Obrazac |
|-------------|---|----------------|---------|
| | HIV | | |
| A1 | TRAJNO ODBIJEN ZBOG HIV INFEKCIJE HIV-RNA pozitivan/anti-HIV pozitivan | Uručiti osobno | OB-681 |
| A2 | TRAJNO ODBIJEN ZBOG HIV INFEKCIJE HIV-RNA negativan/anti-HIV potvrđeno pozitivan | Uručiti osobno | |
| A3 | TRAJNO ODBIJEN ZBOG NEJASNOG anti-HIV POTVRDNOG TESTA HIV-RNA negativan/anti-HIV indeterminantan | Poštom | OB-436 |
| A4 | TRAJNO ODBIJEN ZBOG HIV INFEKCIJE U "WINDOW PERIODU" HIV-RNA pozitivan/anti-HIV negativan | Uručiti osobno | OB-257 |
| M | PRIVREMENA ZABRANA DAVANJA KRVI POZIV NA KONTROLNO TESTIRANJE ZBOG NEPOTVRĐENE anti-HIV REAKTIVNOSTI | Poštom | OB-682 |
| Šifra pisma | Pisma prema rezultatima NAT i seroloških testova | Način | Obrazac |
| | Sifilis | | |
| S1 | TRAJNO ODBIJEN ZBOG AKUTNE SIFILIS INFEKCIJE Anti-TP IB i Anti-TP IgM i RPR pozitivan | Uručiti osobno | OB-351 |
| S2 | TRAJNO ODBIJEN ZBOG DAVNE SIFILIS INFEKCIJE Anti-TP IB pozitivan/Anti-TP IgM i RPR negativan | Uručiti osobno | OB-685 |
| S3 | TRAJNO ODBIJEN ZBOG NEJASNOG anti-TP POTVRDNOG TESTA anti-TP IB indeterminantan | Poštom | OB-431 |
| N | PRIVREMENA ZABRANA DAVANJA KRVI POZIV NA KONTROLNO TESTIRANJE ZBOG NEPOTVRĐENE anti-TP REAKTIVNOSTI | Poštom | OB-684 |
| Šifra pisma | Pisma prema rezultatima NAT i seroloških testova | Način | Obrazac |
| | Ostala/zajednička pisma vezana uz HIV, HBV, HCV i SIF | | |
| KLMN | PRIVREMENA ZABRANA DAVANJA KRVI POZIV NA PONOVRNO KONTROLNO TESTIRANJE KROZ 3-12 MJESECI ZBOG PONOVLJENIH NEPOTVRĐENIH REAKTIVNOSTI U SEROLOŠKIM TESTOVIMA (K=HBsAg, L=anti-HCV, M=anti-HIV, N=anti-TP) | Poštom | OB-432 |
| 1-5 | OBAVIJEST O PONOVRNOM UKLJUČIVANJU U DAVALAŠTVO 1=ZBOG HIV-a, 2=ZBOG HBV-a, 3=ZBOG HCV-a, 4=ZBOG SIFILISA, 5=ZBOG OTKLONJENE SUMNJE NA PRIJENOS INFEKCIJE NA PRIMATELJA | Poštom | OB-433 |
| O | POZIV DAVATELJU U SAVJETOVALIŠTE AO(HIV), BO(HBV), CO(HCV), SO(SIF), O(OBI), O1(ID-NAT IR, anti-HBc+) | Poštom | OB-427 |
| H | PRIVREMENA ZABRANA DAVANJA KRVI POZIV NA KONTROLNO TESTIRANJE ZBOG SUMNJE NA PRIJENOS INFEKCIJE NA PRIMATELJA/TRACE-BACK POSTUPAK | Poštom | OB-434 |
| DF | TRAJNO ODBIJENI ZBOG PONOVLJENE NESPECIFIČNE REAKTIVNOSTI SEROLOŠKIH TESTOVA | Poštom | OB-706 |

4. REZULTATI

U Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek, Odjelu za serološku i imunohematološku dijagnostiku davatelja krvi, od 1.10.2014. do 30.9.2015., probirnim serološkim enzimskim imunotestovima testirano je ukupno 28 263 uzoraka donacija krvi dobrovoljnih davatelja krvi.

Inicijalnim serološkim testiranjem dobiveno je ukupno 175 reaktivnih donacija, nakon retestiranja ukupno 103. Ukupan broj lažno reaktivnih rezultata u odnosu na broj inicijalno reaktivnih rezultata iznosi 72. Broj i postotak lažno reaktivnih rezultata, prema testovima, u odnosu na broj inicijalno reaktivnih rezultata opisani su u Tablici 7.

Tablica 7. Broj lažno reaktivnih rezultata nakon retestiranja serološkim probirnim testovima

| | Broj IR* na ukupan broj donacija | Broj RR† (u odnosu na broj IR* u %) | Broj lažno reaktivnih (u odnosu na broj IR* u %) |
|---------|--|---|---|
| HBV | 68 (0,241) | 32 (47,06) | 36 (52,94) |
| HCV | 36 (0,127) | 23 (63,53) | 13 (36,47) |
| HIV | 46 (0,163) | 30 (65,22) | 16 (34,78) |
| Sifilis | 25 (0,088) | 18 (72,00) | 7 (28,00) |
| Ukupno | 175 (0,619) | 103 (58,86) | 72 (41,14) |

* inicijalno reaktivni

† retestirano reaktivni

Ukupan broj od 72 lažno reaktivna rezultata u odnosu na ukupan broj uzoraka testiranih serološkim testovima (28 263) iznosi 0,25 %. Brojevi i postotci lažno reaktivnih rezultata nakon probirnog serološkog testiranja, prema testovima, opisani su u Tablici 8.

Tablica 8. Broj lažno reaktivnih rezultata nakon probirnog serološkog testiranja

| | Broj IR* (u odnosu na ukupni broj uzoraka u %) | Broj lažno reaktivnih | lažno reaktivni uzorci u odnosu na ukupni broj uzoraka u % |
|-----------|---|--------------------------|--|
| HBsAg | 68 | 36 | 0,13 |
| Anti-HCV | 36 | 13 | 0,05 |
| HIV Ag/At | 46 | 16 | 0,06 |
| Anti-TP | 25 | 7 | 0,03 |
| Ukupno | 175 | 72 | 0,25 |

* inicijalno reaktivni

Usporedbom rezultata serološki retestiranih reaktivnih uzoraka i uzoraka testiranih s ID-NAT-om i potvrdnim serološkim testom dobiven je ukupni broj od pet stvarno reaktivnih uzoraka.

Ukupan broj stvarno reaktivnih rezultata u odnosu na broj retestirano reaktivnih uzoraka u postotku iznosi 4,85 %, a na ukupan broj testiranih uzoraka 0,018 %. Broj i postotak stvarno reaktivnih rezultata nakon probirnog i potvrdnog serološkog testiranja te ID-NAT-a prema testovima, opisan je u Tablici 9.

Tablica 9. Stvarno reaktivni rezultati

| test | RR* serologija | broj ID-NAT reaktivnih | broj potvrđni test reaktivni | Stvarno reaktivni rezultati | |
|---------|----------------|------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | | | U odnosu na br.RR* u % | U odnosu na ukupan broj u % |
| HBV | 32 (0,113) | 3 | 3 | 9,38 | 0,011 |
| HCV | 23 (0,081) | 1 | 1 | 4,35 | 0,004 |
| HIV | 30 (0,106) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Sifilis | 18 (0,064) | NR† | 1 | 5,56 | 0,004 |
| Ukupno | 103 (0,364) | 4 | 5 | 4,85 | 0,018 |

* retestirano reaktivni

ukupan broj uzoraka: n=28263

† nije rađen

Ukupan broj lažno reaktivnih rezultata u odnosu na broj retestirano reaktivnih uzoraka iznosi 95,15 %, a na ukupan broj testiranih uzoraka 0,347 %. Broj i postotak lažno reaktivnih rezultata nakon probirnog i potvrđnog serološkog testiranja te ID-NAT-a prema testovima, opisan je u Tablici 10.

Tablica 10. Lažno reaktivni rezultati

| test | RR* serologija | broj lažno reaktivnih | Lažno reaktivni rezultati | |
|---------|----------------|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| | | | U odnosu na br.RR uzoraka u % | U odnosu na ukupan broj uzoraka u % |
| HBV | 32 | 29 | 90,625 | 0,11 |
| HCV | 23 | 22 | 95,65 | 0,078 |
| HIV | 30 | 30 | 100 | 0,11 |
| Sifilis | 18 | 17 | 94,44 | 0,064 |
| Ukupno | 103 | 98 | 95,15 | 0,347 |

* retestirano reaktivni

ukupan broj uzoraka: n= 28263

Završetkom probirnog i potvrđnog serološkog testiranja te ID-NAT-a i diskriminacijskih molekularnih testiranja usporedili smo dobivene rezultate DDK-a prema uzročnicima.

Rezultati svih testiranja opisani su u Tablicama 11, 12 i 13.

Tablica 11. Usporedba rezultata serološke i molekularne dijagnostike za HBV

| | Serološka dijagnostika | | Molekularna dijagnostika | |
|--------------|------------------------|-------------------|--------------------------|-----------|
| | HBsAg | Potvrdni HBV test | ID-NAT | dHBV |
| uzorak br. 1 | REAKTIVAN | REAKTIVAN | REAKTIVAN | REAKTIVAN |
| uzorak br. 2 | REAKTIVAN | REAKTIVAN | REAKTIVAN | REAKTIVAN |
| uzorak br. 3 | REAKTIVAN | REAKTIVAN | REAKTIVAN | NR* |
| uzorak br. 4 | nereaktivan | NR* | REAKTIVAN | REAKTIVAN |
| uzorak br. 5 | nereaktivan | NR* | REAKTIVAN | NR* |
| Ukupno | 3 | 3 | 5 | 3 |

* nije rađeno

Tablica 12. Usporedba rezultata serološke i molekularne dijagnostike za HCV

| | Serološka dijagnostika | | Molekularna dijagnostika | |
|--------------|------------------------|-------------------|--------------------------|-----------|
| | Anti-HCV | Potvrdni HCV test | ID-NAT | dHCV |
| uzorak br. 6 | REAKTIVAN | REAKTIVAN | REAKTIVAN | REAKTIVAN |
| Ukupno | 1 | 1 | 1 | 1 |

Tablica 13. Usporedba rezultata serološke probirne i potvrđne dijagnostike za sifilis

| | Serološka dijagnostika | | Nema molekularne dijagnostike |
|--------------|------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| | Anti-TP | Potvrđni anti-TP test | |
| uzorak br. 7 | REAKTIVAN | REAKTIVAN | |
| Ukupno | 1 | 1 | |

Od 30 uzoraka retestirano reaktivnih u HIV Ag/At probirnom serološkom testu, niti jedan uzorak nije dao reaktivan rezultat u serološkom potvrđnom testu, niti u probirnom molekularnom ID-NAT-u.

Usporedbom dobivene i propisane specifičnosti testa dokazali smo da se vrijednost dobivenih specifičnosti testova nalazi u rasponu deklariranom od strane proizvođača. Ovim smo podacima potvrdili nalaze validacijskog izvješća o probirnim serološkim enzimskim imunotestovima koji su u uporabi. U Tablici 14. navedene su dobivene i propisane specifičnosti testova.

Tablica 14. Usporedba dobivene i propisane specifičnosti testa

| test | broj lažno reaktivnih* | lažno reaktivni u %* | dobivena specifičnost testa u % | propisana specifičnost testa u % |
|-----------|------------------------|----------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| HBsAg | 29 | 0,11 | 99,89 | 99,28 - 99,92 |
| anti-HCV | 22 | 0,078 | 99,92 | 99,88 - 100 |
| HIV Ag/At | 30 | 0,11 | 99,89 | 99,78 -99,95 |
| anti-TP | 18 | 0,064 | 99,94 | 99,88 - 100 |

* na ukupan broj testiranih: n=28263

Privremeno ili trajno isključivanje davatelja iz baze davatelja, odnosno, obavještanje davatelja o dobivenim rezultatima opisano je u Tablici 15. Tablica je rađena prema algoritmima evaluacije davatelja sa serološkom i molekularnom reaktivnošću za svaki test. Prema dobivenim rezultatima nakon kontrolnog testiranja, davatelju je određen profil (Profili DDK, str. 28.).

Tablica 15. Privremeno ili trajno odgođeni davatelji

| | Privremeno odgođeni | Nije se odazvao | Trajno odgođeni | PROFIL | | |
|---------|---------------------|-----------------|-----------------|--------|---|---|
| | | | | A | B | C |
| HBV | 10 | 2 | 5 | 2 | 1 | 2 |
| HCV | 6 | 1 | 3 | 1 | 0 | 2 |
| HIV | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Sifilis | 6 | 1 | 5 | 0 | 0 | 5 |

Opis profila:

Profil A - obuhvaća sve zaražene DDK kod kojih je potvrdnim testom dokazan virusni genom i serološki biljeg infekcije.

Profil B - odgovara davateljima krvi koji se nalaze u ranoj fazi infekcije („window period“) ili imaju okultnu hepatitis B virusnu infekciju (OBI).

Profil C - ima različito značenje za različite virusne infekcije i ishode kontrolnih testiranja.

Detaljan opis profila C nalazi se u odjeljku 3.2. METODE, str. 28.

5. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je probir pozitivnih doza krvi obveznim serološkim probirnim testiranjem na uzročnike hepatitisa B, hepatitisa C, HIV bolesti i sifilisa od 1.10.2013. do 30.9.2014. Koristeći serološke enzimске imunotestove probirno su testirana 28 263 uzorka na sva četiri navedena uzročnika. Svrha probirnog testiranja bila je izdvajanje reaktivnih i suspektnih donacija iz baze prikupljenih donacija. Iz tog su razloga korišteni probirni testovi visoke osjetljivosti koji su nam sa sigurnošću izdvojili stvarno reaktivne uzorke, ali i uzorke koji su bili slabo reaktivni, graničnih vrijednosti ili su na bilo koji način davali nejasne rezultate.

Rezultati probira, prikazani u Tablici 7., pokazuju broj lažno reaktivnih rezultata nakon retestiranja serološkim probirnim testovima. Na ukupan broj testiranih uzoraka (28 263) broj lažno reaktivnih rezultata nakon retestiranja serološkim probirnim testovima kreće se u rasponu 0,03 - 0,13 %, ovisno o testu, HBV 36 (0,13 %), HCV 13 (0,05 %), HIV 16 (0,06 %) i sifilis 7 (0,03 %). Ukupan broj lažno pozitivnih rezultata na ukupan broj testiranih iznosi 0,25 %.

Broj ponovljeno reaktivnih seroloških rezultata u našem Kliničkom zavodu za navedeno razdoblje ukupno iznosi 0,364 % (HBV 0,113 %, HCV 0,081 %, HIV 0,106 %, sifilis 0,064 %). Za usporedbu, u 2013. godini u RH broj ponovljeno reaktivnih seroloških rezultata iznosio je ukupno 0,318 %, (HBV 0,044 %, HCV 0,098 %, HIV 0,044 %, sifilis 0,133 %). Iz tih se podataka može zaključiti da je postotak ponovljeno reaktivnih rezultata za HCV podjednak na razini našeg Kliničkog zavoda i RH, dok je za HBV i sifilis nešto niži u našem Kliničkom zavodu u odnosu na RH, a za HIV je viši na razini Kliničkog zavoda u odnosu na razinu u RH (28).

Broj retestirano reaktivnih (RR) rezultata manji je od broja inicijalno reaktivnih (IR) što se može povezati s velikom osjetljivošću testa, kvalitetom uzorka te njegovom pripremom. Prije svakog testiranja provjerena je kvaliteta serumskih uzoraka (je li uzorak dobro koaguliran, bez prisutnosti fibrina ili fibrinskih niti. Lipemični, ikterični ili hemolizirani uzorci nisu zadovoljavali kriterije za testiranje zbog mogućeg utjecaja na rezultat testiranja.

Prema broju lažno reaktivnih rezultata, cilj nam je bio dokazati nalazi li se vrijednost dobivene specifičnosti testa u rasponu navedenih specifičnosti za svaki test pojedinačno. S obzirom na to da su korištene tri platforme testova, specifičnost je izražena u obliku raspona. U Tablici 14., Usporedba dobivene i propisane specifičnosti testa, dokazano je da se

vrijednost dobivenih specifičnosti testova nalazi u rasponu propisanih specifičnosti za svaki od testova. Tim podacima potvrđeni su nalazi validacijskog izvješća seroloških probirnih testova u uporabi. To je vrlo važan pokazatelj ocjene korištenja testova odnosno ocjene kvalitete i sigurnosti rada laboratorija.

Rezultati potvrdnog serološkog testiranja navedeni su, za usporedbu, uz rezultate ID-NAT testiranja i rezultate retestirano reaktivnih seroloških testova u Tablicama 11., 12. i 13.: Usporedba rezultata serološke i molekularne dijagnostike za HBV, HCV i HIV1.

U našem Kliničkom zavodu od 1.10.2013. do 30.9.2014. godine, broj ukupno reaktivnih potvrdnih rezultata iznosio je 0,018 % (HBV 0,011 %, HCV 0,004 %, sifilis 0,004 %, HIV reaktivnih nije bilo). Za usporedbu, u 2013. godini u RH broj ukupno reaktivnih potvrdnih rezultata iznosio je 1,022 %, (HBV 0,008 %, HCV 1,008 %, HIV 0,002 % te sifilis 0,004 % (28). Iz usporedbe je zaključeno da je postotak ukupno reaktivnih rezultata u našem Kliničkom zavodu niži od postotka ukupno reaktivnih rezultata u RH. Jedan od razloga približne stope incidencije HBV-a je probir davatelja Osječko-baranjske županije proveden prije nekoliko godina na anti-HBc. S obzirom na to da je anti HBc najdugotrajniji marker HBV infekcije koja je prošla, isto je tako i pokazatelj trenutne akutne ili kronične HBV infekcije te je njegov probir preporučen u nekoliko zemalja u kojima je prevalencija hepatitisa B niska poput Kanade, Francuske, Njemačke i Sjedinjenih Američkih Država u svrhu detekcije davatelja inficiranih HBV-om (29). Reaktivan anti HBc uz nisko detektabilnu ili nedetektabilnu HBV-DNK u uzorku jedan je od glavnih pokazatelja OBI-a.

Istovremeno, uz serološko probirno i potvrdno testiranje provedeno je i inicijalno molekularno ID-NAT testiranje u HZTM-u svih uzoraka prikupljenih u RH. Od ukupno 147664 uzorka testirana ID-NAT-om i diskriminacijskim testovima, ukupno je bilo 40 (61) retestirano reaktivnih donacija, 30 HBV-DNK (0,020 %), 7 HCV-RNK (0,004 %) i 3 HIV1-RNK (0,002 %). Uz to ID-NAT-om detektirana je i 21 OBI (0,01 %). Tablica 9. prikazuje stvarno reaktivne rezultate nakon ID-NAT-a i potvrdnih seroloških testiranja (u uzorcima prikupljenih donacija u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu KBC-a Osijek). Od ukupnog broja donacija uzorcima našeg Kliničkog zavoda pripadaju 28263 donacije od kojih su tri donacije pozitivne na HBV-DNK (0,011 %), jedna donacija pozitivna na HCV-RNK (0,004 %) te jedna donacija pozitivna na OBI (0,004 %). Usporedbom dobivenih rezultata vidljivo je da su prevalencije HBV-a i HIV-a veće na razini RH nego u našem Kliničkom zavodu, dok je prevalencija HCV-a na istoj razini.

Prevalencija HBV-a je veća u odnosu na prevalenciju HCV-a, HIV-a i sifilisa kako na području RH tako i u području našeg Kliničkog zavoda.

Za usporedbu, HBV je u 2010. godini najčešće otkriven uzročnik kod davatelja krvi u Ujedinjenom Kraljevstvu i čini skoro trećinu pozitivnih (30). Procijenjeni rezidualni rizik za transfuzijom prenesenu HBV infekciju i u Sjedinjenim Američkim Državama je primjetno veći nego za HCV ili HIV (31).

U osoba koje prvi put doniraju krv, prevalencija HBsAg-a nosilaštva je vrlo niska i u kontinuiranom smanjenju. Krajem devedesetih godina prevalencija HBsAg-a nosilaštva kod prvih dobrovoljnih davatelja krvi bila je 0,4 %, a zadnjih nekoliko godina je oko 0,1 %. Seroprevalencija anti-HCV protutijela u osoba koje prvi puta 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 % (32).

Kod sifilisa, koji za razliku od HBV-a, HCV-a i HIV-a nema molekularnu dijagnostiku, evaluacija sifilis reaktivnog uzorka rađena je prema potvrdnom serološkom testu koji je u jednom uzorku od ukupno 18 testiranih bio reaktivan (0,004 %) što je jednako prevalenciji na razini RH.

Jednako važan zadatak uz otkrivanje je i privremeno ili trajno isključivanje DDK-a iz baze DDK-a, odnosno obavještavanje DDK-a o dobivenim rezultatima. Cijeli postupak obavještavanja i isključivanja DDK-a služi u svrhu privremene ili trajne odgode za buduća davanja krvi.

Od 10 privremeno odgođenih DDK-a zbog HBV reaktivnog ili suspektnog rezultata nakon kontrolnih testiranja, samo je njih 5 dobilo trajnu odgodu. Dva DDK-a pripadaju profilu A, jedan profilu B i dva profilu C. Dva se DDK-a nisu odazvala na pismo o privremenoj odgodi. Dva su DDK-a vraćena u davalaštvo, a jedan je davatelj ponovo naručen na kontrolno testiranje.

Od šest privremeno odgođenih DDK-a zbog HCV reaktivnog ili suspektnog rezultata nakon kontrolnog testiranja, jedan je DDK dobio trajnu odgodu i pripada profilu A, dok su dva DDK-a trajno odgođeni jer pripadaju profilu C zbog nejasnog potvrdnog testa i nespecifične reakcije.

Od tri privremeno odgođenih DDK-a zbog HIV suspektnog nalaza, dva su DDK-a vraćena u davalaštvo, a jedan je pozvan na kontrolno testiranje.

Od šest privremeno odgođenih DDK-a zbog suspektnog anti-TP testa, njih je pet dobilo trajnu odgodu zbog nespecifične reakcije, profil C, a jedan se DDK nije odazvao obavijesti.

Veliki problem predstavljaju davatelji koji se iz nepoznatog razloga ne odazivaju na pisma koja su im poslana. Svrha tih pisama je stalna briga o zdravlju davatelja.

Razlika serološke i molekularne dijagnostike nije samo u principu testa, vrsti uzorka već i u činjenici da je WP za serološke testove znatno duži od WP-a ID-NAT-a. Prema Tablici 2., Prosječne vrijednosti *WP-a* za testove koji se koriste u ispitivanju davatelja krvi, možemo zaključiti da su smanjenjem WP-a koje smo dobili uvođenjem ID-NAT testa porasle kvaliteta i sigurnost transfuzijskog liječenja.

ID-NAT i diskriminacijski testovi vrlo su korisni u rješavanju lažno reaktivnih rezultata donacija dobivenih serološkim metodama što je jako važno za obavještanje i savjetovanje davatelja (32).

6. ZAKLJUČCI

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

- Od 1.10.2014. do 30.9.2015. u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek, izvršen je probir uzoraka donacija DDK na uzročnike hepatitisa B, hepatitisa C, HIV bolesti i sifilisa testiranjem 28 263 uzoraka krvi donacija. U probirnom serološkom testiranju korištene su metode i testovi zadnje generacije koji su u skladu s propisanim zakonom Republike Hrvatske.

- U Kliničkom zavodu ukupno su bila 103 (0,364 %) retestirano reaktivna serološka rezultata. Od toga 32 (0,113 %) pripada HBV-u, 23 (0,081 %) HCV-u, 30 (0,106 %) HIV-u te 18 (0,064 %) sifilisu. Na razini RH, ukupno su bila 583 (0,318 %) retestirano reaktivna serološka rezultata. Od toga 80 (0,044 %) pripada HBV-u, 180 (0,098 %) HCV-u, 80 (0,044 %) HIV-u te 243 (0,133 %) sifilisu.

- Ukupna je prevalencija uzročnika zaraznih bolesti prenosivih krvlju, nakon retestiranja istim testom, u našem Kliničkom zavodu u odnosu na RH slična, dok je prema uzročnicima, na razini RH i našeg Kliničkog zavoda podjednaka kod HCV-a. HBV i HIV imaju veću prevalenciju u našem Kliničkom zavodu, dok sifilis ima veću prevalenciju na razini RH.

- Na razini Kliničkog zavoda ukupan broj lažno reaktivnih uzoraka iznosio je 72 (0,25 %). Od toga 36 (0,13 %) pripada HBV-u, 13 (0,05 %) HCV-u, 16 (0,06 %) HIV-u i 7 (0,03 %) sifilisu. Uz pomoć retestirano lažno reaktivnih rezultata potvrdili smo specifičnost testa i na taj način potvrdili nalaze validacijskih izvješća svakog pojedinog testa.

- U Kliničkom zavodu ukupno je bilo 5 (0,018 %) stvarno reaktivnih seroloških rezultata. Od toga 3 (0,011 %) pripada HBV-u, 1 (0,004 %) HCV-u te 1 (0,004 %) sifilisu, dok HIV-a nije bilo. Na razini RH ukupno je bilo 41 (0,022 %) stvarno reaktivnih seroloških rezultata. Od toga 15 (0,008 %) pripada HBV-u, 14 (0,008 %) HCV-u, 4 (0,002 %) HIV-u i 8 (0,004 %) sifilisu.

- Prema rezultatima potvrdnih seroloških testova, ukupna je prevalencija te prevalencija HBV-a, HCV-a i sifilisa slična u našem Kliničkom zavodu i u RH, dok je prevalencija HIV-a viša u RH u odnosu na naš Klinički zavod u kojem nismo imali slučajeva HIV-a.

- Prevalencija HBV reaktivnih u Kliničkom zavodu od 0,011 % približna je prevalenciji HBV reaktivnih u HR od 0,008 % iz razloga probirnog testiranja DDK-a na anti-HBc.

- Kod molekularne dijagnostike (ID-NAT i diskriminacijski testovi) prevalencija HBV-a u našem Kliničkom zavodu (0,011 %) veća je od prevalencije HCV-a (0,004 %), HIV-a (0 %) i sifilisa (0,004 %). Prevalencija HBV-a na razini RH (0,020 %) veća je od prevalencije HCV-a (0,004 %), HIV-a (0,002 %) i sifilisa (0,004 %).

Prema rezultatima molekularne dijagnostike vidljivo je da je prevalencija HBV-a na razini RH duplo veća u odnosu na razinu našeg Kliničkog zavoda, dok su prevalencije HCV-a i sifilisa podjednake. Prevalencije HIV-a na razini našeg Kliničkog zavoda nema, a na razini RH je u malom postotku.

- Obveznim serološkim i molekularnim testiranjima na uzročnike zaraznih bolesti prenosivih krvlju od 1.10.2014. do 30.9.2015. iz baze donacija izdvojeno je 25 donacija. Krv i krvni pripravci (~ 75) pripremljeni iz tih donacija označeni su nesukladnima, izdvojeni iz baze pripravaka za korištenje i propisno zbrinuti. Pismom o privremenoj odgodi davatelji su blokirani za daljnja davanja krvi do razrješenja statusa. Na taj je način direktno sprječena kontakt sa suspektnom ili reaktivnom donacijom i eventualni daljnji prijenos uzročnika zaraznih bolesti prenosivih krvlju. U tom razdoblju 10 je davatelja trajno odgođeno i na taj je način povećana kvaliteta i sigurnost transfuzije krvi.

- Uvođenjem ID-NAT-a i diskriminacijskih testova smanjen je WP. Osjetljivost ID-NAT-a 100 % i specifičnost diskriminacijskih testova 100 %, mogućnost detekcije i umnožavanja vrlo malih količina uzročnika velike su prednosti molekularne dijagnostike.

Kombinacijom serološkog i molekularnog testiranja odnosno zbrojem kvaliteta koje pokazuju i jedna i druga vrsta testiranja, kao i uporabom transfuzijskog programa "e-Delphyn" koji pridonosi standardizaciji u prikupljanju, obradi i korištenju donacija krvi, podignuta je kvaliteta i sigurnost transfuzijskog liječenja.

7. SAŽETAK

Dragovoljno, besplatno i redovno davalaštvo prvi su koraci u smanjenju rizika prijenosa zaraznih bolesti prenosivih krvlju. Rigorozno, probirno i potvrdno serološko testiranje osjetljivim i visoko specifičnim testovima najnovijih generacija na tržištu, podižu kvalitetu i sigurnost probirnog testiranja uzoraka donacija krvi.

Postotak retestirano reaktivnih seroloških uzoraka od 1.10.2013. do 30.9.2014. u našem Kliničkom zavodu približne je vrijednosti postotku retestirano reaktivnih seroloških uzoraka u 2013. godini u RH, dok je postotak reaktivnih potvrdnih uzoraka u našem Kliničkom zavodu u istom razdoblju znatno manji od postotka reaktivnih potvrdnih uzoraka u RH u 2013. godini. Postotak retestirano reaktivnih uzoraka molekularnim metodama za HBV na razini RH duplo je veći u odnosu na razinu postotka našeg Kliničkog zavoda, dok je postotak HCV-a podjednak. Prisutnosti HIV-a na razini našeg Kliničkog zavoda nema, a na razini RH postotak je HIV-a nizak.

Uzročnici zaraznih bolesti prenosivih krvlju predstavljaju globalni javnozdravstveni problem. Uz veliku proširenost, razlog su i veliki ekonomski troškovi liječenja te veliki broj komplikacija. Izdvajanjem reaktivnih, suspektnih ili nesukladnih donacija, evaluiranih prema Postupku evaluacije doza i davatelja krvi prema rezultatima NAT-a i seroloških testova u transfuzijskoj djelatnosti RH, Klinički je zavod za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek, Odjel za serološku i imunohematološku dijagnostiku davatelja krvi poput svih ostalih Regionalnih centara i transfuzijskih službi unaprijedio i standardizirao postupke vezane za serološku i molekularnu obradu prikupljenih donacija krvi.

Uvođenjem molekularne dijagnostike i novih visokospecifičnih metoda, smanjenjem WP-a, standardizacijom rada u laboratoriju, uvođenjem transfuzijskog programa e-Delphyn, automatizacijom i umrežavanjem aparata s mogućnošću automatskog prijenosa rezultata testiranja, pridržavanjem principa dobre laboratorijske prakse kao i pravilnom primjenom krvi i krvnih pripravaka, smanjen je rizik prijenosa uzročnika zaraznih bolesti prenosivih krvlju na primatelja i podignuta je razina kvalitete i sigurnosti transfuzijskog liječenja.

Ključne riječi: serološka, dijagnostika; ID-NAT; davatelj; donacija; transfuzija;

8. SUMMARY

Voluntary, free and regular donation are the first steps in reducing the risk of transmission infectious diseases transmitted by blood. Rigorous, screening and affirmative serological testing on a sensitive and highly specific tests of the latest generation of the market, improve the quality and safety of screening tests samples of blood donation.

Percentage retest reactive serological samples for a period of 01. 10. 2013. – 30. 09. 2014. in our Clinical Department approximate the value percentage retest reactive serologic samples in 2013 in Croatia, while the percentage of reactive confirmatory samples in our Clinical Department in the same period is significantly lower than the percentage of reactive confirmatory samples in Croatia in 2013. The percentage of reactive retest samples by molecular methods for HBV at the national level was twice higher compared to the percentage of our Clinical Institute while the percentage of HCV is equal. Presence of HIV at the level of our Clinical Department not exists and the national level the percentage of HIV is low.

Infectious agents transmitted blood is a global public health problem. Also, the reasons are, with a large extent, the huge economic costs of treatment and a large number of complication. By separating reactive, suspected or non-conforming donations, evaluated according to The evaluation process dose and blood donors according to the results of NAT and serological tests in transfusion activities of Croatia, the Institute for Clinical Transfusion Medicine Clinical Hospital Osijek, Department of serological and immunohaematological diagnostic blood donors, like all other regional centers and transfusion services improve and standardize procedures related to serological and molecular processing of collected blood donations.

With introduction of molecular diagnostics and new highly specific method, reducing the WP, standardization work in the laboratory, with introduction of transfusion program e-Delphyn, automation and networking appliances with automatic transmission results testing, compliance with the principles of good laboratory practice and the proper application of blood and blood products reduced the risk of transmission of infectious agents transmitted with blood on recipients and raising the level of quality and safety of blood transfusion therapy.

Keywords: serological, diagnostics; ID-NAT; provider; donation; transfusion.

9. LITERATURA

1. Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Referentni centar ministarstva zdravlja za transfuzijsku medicinu. Postupak evaluacije doza i davatelja krvi prema rezultatima NAT i seroloških testova u transfuzijskoj djelatnosti RH. Dostupno na adresi: www.hztn.hr/dokumenti/postupak-za-evaluaciju-doza-krvi-i-davatelja-krvi-2016.pdf. veljača 2015. Datum pristupa: 7.6.2016.
2. World Health Organization. What is hepatitis?; Dostupno na adresi: <http://www.who.int/features/qa/76/en/>. Datum pristupa: 7.6.2016.
3. World Health Organization. HEPATITIS B; Dostupno na adresi: <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsrlyo20022/en/index2.html>. Datum pristupa: 7.6.2016.
4. World Health Organization. HEPATITIS B. Dostupno na adresi: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>. Datum pristupa: 7.6.2016.
6. Lesnikar V. Prevencija hepatitisa B i hepatitisa C. Acta Med Croatica 2005; 377-81
7. Hrvatska udruga za borbu protiv HIV-a i virusnog hepatitisa. Liječenje hepatitisa C. Dostupno na adresi: <http://huhiv.hr/lijecenje-hepatitisa-c-hcv/> Datum pristupa: 11.6.2016.
8. Balen S. Osnove transfuzijske medicine. Osijek: Medicinski fakultet Osijek; 2010
9. World Health Organization. HEPATITIS C; Dostupno na adresi: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>. Datum pristupa: 7.6.2016.
10. Radić D, Premužić M, Knežević Štromar I, Ostojić R. Nove terapije u liječenju kronične hepatitis C-infekcije Zavod za gastroenterologiju i hepatologiju Klinika za unutarnje bolesti KBC Zagreb i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu 10000 Zagreb, Kišpatićeva 12
11. Kalenić S. i suradnici. Medicinska mikrobiologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2013.
12. World Health Organization. Global Incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections - 2008. Dostupno na adresi: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75181/1/9789241503839_eng.pdf?ua=1. Datum pristupa: 11.6.2016.

13. Direktorat za kvalitetu u medicini i zdravstvu Vijeća Europe (EDQM). Preporuke za pripravu, uporabu i osiguranje kvalitete krvnih pripravaka (17. izdanje). Dostupno na adresi: <https://zdravlje.gov.hr/UserDocsImages/dokumenti/Tekstovi%20razni/Preporuke%20za%20pripravu%20uporabu%20i%20osiguranje%20kvalitete%20krvnih%20pripravaka%20final!.docx>
14. DiaSorin S.p.A. MurexHBsAgVersion 3 ELISA infectious disease. Dostupno na adresi: http://www.diasorin.com/sites/default/files/allegati_prodotti/Murex%20HBsAG%20Version%203.pdf. Datum pristupa: 16.6.2016.
15. Schobel U, Dengler T, Doerr HW, Echevarria JM, Gerlich WH, Gottschalk J i sur. Multicenter study of the new highly sensitive and specific Enzygnost HBsAg 6.0 assay. Dostupno na adresi: [http://www.blutspendezurich.ch/Media/File/Archiv%20div.%20Daten/Abstract%20Multicenter%20study%20Enzygnost%20HBsAg%206_0%20ISBT%202010%20Berlin\(1\).pdf](http://www.blutspendezurich.ch/Media/File/Archiv%20div.%20Daten/Abstract%20Multicenter%20study%20Enzygnost%20HBsAg%206_0%20ISBT%202010%20Berlin(1).pdf). Datum pristupa: 16.6.2016.
16. Bio-Rad. MonolisaHBsAg ULTRA Confirmatory. Dostupno na adresi: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/en/Literature/inserts/883588_GB.pdf. Datum pristupa: 16.6.2016.
17. DiaSorin S.p.A. Murexanti-HCV (version 4.0). Dostupno na adresi: http://www.diasorin.com/sites/default/files/allegati_prodotti/Murex%20Anti-HCV%20Version%204.0.pdf. Datum pristupa: 16.6.2016.
18. Comparison of Four Commercial Screening Assays For Diagnosis of HTLV-1-2. Dostupno na adresi : <http://research.htlv1.com/Full%20Text/Comparison%20of%20Four%20Commercial%20Screening%20Assays%20For%20Diagnosis%20of%20HTLV-1-2.pdf>
19. Bio-Rad. Monolisa Anti-HCV PLUS Version 3. Dostupno na adresi: http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/en/883635_EN.pdf. Datum pristupa: 16.6.2016.
20. DiaSorin S.p.A. Murex HIV Ag/Ab Combination. Dostupno na adresi: http://www.diasorin.com/sites/default/files/allegati_prodotti/Murex%20HIV%20AgAb%20Combination.pdf. Datum pristupa: 16.6.2016.

21. Siemens Healthcare Diagnostics. The next level of proven HIV testing Enzygnost HIV integral 4 assay. Dostupno na adresi: http://static.healthcare.siemens.com/siemens_hwem-hwem_ssxa_websites-context-root/wcm/idc/groups/public/@global/@clinicalspec/documents/download/mday/mjq4/~edisp/enzygnost_hiv_integral_4_brochure_final-01178259.pdf. Datum pristupa: 16.6.2016.
22. Bio-Rad. Genscreen ULTRA HIV Ag-Ab. Dostupno na adresi: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/en/883637_2013_10_EN.pdf. Datum pristupa: 16.6.2016.
23. DiaSorin S.p.A. ICE* Syphilis. Dostupno na adresi: http://www.diasorin.com/sites/default/files/allegati_prodotti/ICE%20Syphilis.pdf. Datum pristupa: 16.6.2016.
24. Dade Behring. Enzygnost Syphilis. Dostupno na adresi: http://www.medcorp.com.br/medcorp/upload/downloads/enzygnost%20syphilis_2006329121156.pdf. Datum pristupa: 16.6.2016.
25. Bio-Rad. Syphilis Total Ab. Dostupno na adresi: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/hr/883679_HR.pdf. Datum pristupa: 16.6.2016.
26. US Food and Drug administration, Procleix Ultrio Plus Assay. Dostupno na: www.fda.gov/downloads/biologicsbloodvaccines/bloodbloodproducts/approvedproducts/licensedproductsblas/blooddonorscreening/infectiousdisease/ucm092120.pdf. Datum pristupa: 16.6.2016.
27. Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu. Zbirka pisama davateljima krvi sadržana u e-Delphyn računalnom programu za rad u transfuzijskoj djelatnosti. Dostupno na adresi: <http://www.hztm.hr/dokumenti/pisma-davateljima-krvi-hrvatska2016-za-stampanje.pdf>. Datum pristupa: 18.6.2016.
28. Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu. Transfuziološki vjesnik, Zagreb 2014/2015.
29. Romano L, Velati C, Cambie G, Fomiatti L, Galli C, Zanetti AR i sur. Hepatitis B virus infection among first time blood donors in Italy: prevalence and correlates between serological patterns and occult infection. Dostupno na adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3626481/>. Datum pristupa 14.09.2016.

30. Rosenberg GK, Lattimore S, Brailsford SR, Hewitt PE, Tettmar KI, Kitchen AD i sur. The diversity of chronic hepatitis B virus infections within blood donors in England and North Wales 2005 through 2010. Dostupno na adresi:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23216332>.
31. Stramer SL, Notari EP, Krysztof DE, Dodd Ry. Hepatitis B virus testing by minipool nucleic acid testing: does it improve blood safety?
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23607261>
32. Hans R, Marcaha N. Nucleic acid testing-benefits and constraints. Dostupno na adresi:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3943139/>
33. Kaić B i sur. Epidemiologija virusnih hepatitisa. *Acta Med Croatica*; 2013; 67: 273-79

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Marko Slavulj
Datum i mjesto rođenja: 18. listopada 1990., Osijek
Adresa stanovanja: Duga 118, Ivanovac
E-mail: mslavulj@gmail.com

OBRAZOVANJE

1997. - 2005. - osnovno obrazovanje
2005. - 2009. - "I. gimnazija" Osijek, Opći smjer