

# Serološka i molekularna dijagnostika hepatitis B virusne infekcije u dobrovoljnih davatelja krvi u Kliničkom bolničkom centru Osijek.

---

Lovrić, Nikolina

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:429998>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike**

**Nikolina Lovrić**

**SEROLOŠKA I MOLEKULARNA  
DIJAGNOSTIKA HEPATITIS B  
VIRUSNE INFEKCIJE U  
DOBROVOLJNIH DAVATELJA KRVI U  
KBC OSIJEK**

**Završni rad**

**Osijek, 2017.**

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 davatelja krvi i Odjelom za dijagnostiku krvlju prenosivih bolesti, Odsjekom za potvrdno testiranje Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu, Petrova 3, Zagreb.

Mentor rada: doc. dr. sc. Snježana Džijan

Rad ima 37 listova, 8 tablica i 3 slike

## **ZAHVALA**

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Snježani Džijan na podršci i velikoj stručnoj pomoći tijekom izrade ovog završnog rada. Hvala što je uvijek imala strpljenja i vremena.

Posebnu zahvalnost iskazujem zaručniku Marku te na kraju, ali ne manje važno, zahvaljujem svom bratu i roditeljima koji su uvijek bili uz mene i pomagali mi i bez kojih ovo ne bi bilo moguće.

## SADRŽAJ:

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. TRANSFUZIJA KRVI .....	1
1.2. HEPATITIS B .....	2
1.2.1. HEPATITIS B VIRUS .....	3
1.2.2. OBLICI HEPATITISA .....	4
1.2.2.1. AKUTNA INFEKCIJA .....	4
1.2.2.2. KRONIČNA INFEKCIJA .....	4
1.2.2.3. OKULTNA INFEKCIJA .....	5
1.2.3. HEPATITIS B VIRUSNI MARKERI .....	5
1.3. PATOGENEZA .....	7
1.4. DIJAGNOSTIČKI PROZOR .....	7
1.5. PREVENCIJA I LIJEČENJE HBV INFEKCIJE .....	7
1.6. EPIDEMIOLOGIJA .....	8
<b>2. CILJEVI RADA</b> .....	<b>9</b>
<b>3. ISPITANICI I METODE</b> .....	<b>10</b>
3.1. ISPITANICI .....	10
3.2. METODE .....	11
3.2.1. SEROLOŠKA DIJAGNOSTIKA .....	11
3.2.1.1. POVRŠINSKI ANTIGEN HEPATITISA B (HBsAg) .....	12
3.2.1.2. PRINCIP SEROLOŠKOG HBsAg TESTA .....	13
3.2.1.3. INTERPRETACIJA REZULTATA PROBIRNOG SEROLOŠKOG HBsAg TESTA .....	14
3.2.1.4. POTVRDNI SEROLOŠKI TESTOVI NA HBV .....	14
3.2.2. MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA .....	15
3.2.2.1. INDIVIDUALNI TEST ZA DOKAZIVANJE NUKLEINSKIH KISELINA „INDIVIDUAL DONOR-NUCLEIC ACID TESTING“ (ID-NAT) .....	15
3.2.2.2. PRINCIP INDIVIDUALNOG TESTA ZA DOKAZIVANJE NUKLEINSKIH KISELINA .....	16
3.2.2.3. INTERPRETACIJA INDIVIDUALNOG TESTA ZA DOKAZIVANJE NUKLEINSKIH KISELINA .....	17
3.2.2.4. DISKRIMINACIJSKI HBV TEST (dHBV) .....	17
3.2.2.5. PRIVREMENA ILI TRAJNA ODGODA DDK-a .....	19
3.3. KRVNI PRIPRAVCI .....	19
3.3.1. VRSTE KRVNIH PRIPRAVAKA .....	20
3.4. STATISTIČKE METODE .....	21

<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>22</b>
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>27</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>30</b>
<b>7. SAŽETAK.....</b>	<b>32</b>
<b>8. SUMMARY.....</b>	<b>33</b>
<b>9. LITERATURA .....</b>	<b>35</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>37</b>

**POPIS KRATICA KORIŠTENIH U RADU** (abecednim redom):

AE – Akridinij ester (engl. Acridinium ester)

ALT – Alanin aminotransferaza

anti-HBc – Protutijelo na jezgreni antigen (engl. Anti-hepatitis B core)

anti-HBe – Protutijelo na antigen ovojnice (engl. Anti-hepatitis B envelope)

anti-HBs – Protutijelo na površinski antigen (engl. Anti-hepatitis B surface)

anti-TP – Protutijelo na Treponemu Pallidum (engl. Anti-Treponema Pallidum)

AST – Aspartat aminotransferaza

BC – Granični sloj između stanica i plazme (engl. Buffy coat)

cccDNA – Kovalentno zatvorena kružna DNK (engl. Covalently closed circle DNA)

cDNA – Komplementarna DNK (engl. Complementary DNA)

DDK – Dobrovoljni davatelj krvi

dHBV – Diskriminacijski test hepatitis B virusa

dHCV - Diskriminacijski test hepatitis C virusa

dHIV1 - Diskriminacijski test za virus humane imunodeficijencije

DKA – Dvostruki kinetički test (engl. Dual kinetic assay)

DNK – Deoksiribonukleinska kiselina

HBcAg – Hepatitis B jezgreni antigen (engl. Hepatitis B core antigen)

HBeAg – Hepatitis B antigen ovojnice (engl. Hepatitis B envelope antigen)

HBsAg – Hepatitis B površinski antigen (engl. Hepatitis B surface antigen)

HBV – Hepatitis B virus

HBV DNK – Deoksiribonukleinska kiselina hepatitis B virusa

HCV – Hepatitis C virus

HCV RNK – Ribonukleinska kiselina hepatitis C virusa

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

HIV1 – Virus humane imunodeficijencije tipa 1 (engl. Human immunodeficiency virus type 1)

HIV1 RNK – Ribonukleinska kiselina virusa humane imunodeficijencije tipa 1

HIV2 – Virus humane imunodeficijencije tipa 2 (engl. Human immunodeficiency virus type 2)

HLA – Humani leukocitni antigen (engl. Human leukocyte antigen)

HZTM – Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

ID-NAT – Individualno testiranje nukleinske kiseline davatelja (engl. Individual donor nucleic acid testing)

IFCR – Međunarodni crveni križ (engl. International federation of Red cross)

ISBN – Međunarodna udruga transfuziološke nomenklature (engl. international society of blood transfusion nomenclature)

KBC Osijek – Klinički bolnički centar Osijek

KE – Koncentrat eritrocita

KESBL – Koncentrat eritrocita sa smanjenim brojem leukocita

KTSBL – Koncentrat trombocita sa smanjenim brojem leukocita dobiven trombaferezom

KZTM – Klinički zavod za transfuzijsku medicinu

NAT – Test amplifikacije nukleinske kiseline (engl. Nucleic acid amplification testing)

OBI – Okultna hepatitis B virusna infekcija (engl. Occult hepatitis B virus infection)

RH – Republika Hrvatska

RNK – Ribonukleinska kiselina

SSP – Svježe smrznuta plazma

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

TMA – Transkripcijski ovisna amplifikacija

TMB – 3, 3', 5, 5' - tetrametilbenzidin

TPNP – Test pretraživanja na neočekivana protutijela

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. World health organization)

WP – „Dijagnostički prozor“ (engl. Window period)



## 1. UVOD

Hepatitis B jedan je od vodećih zdravstvenih problema. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO) na svijetu je više od 240 milijuna ljudi oboljelo od hepatitisa B. Hepatitis B virus (HBV) pripada skupini uzročnika krvlju prenosivih bolesti i stoga se sve prikupljene donacije krvi obvezno testiraju na njegovu prisutnost. Zaraza HBV-om najučestalija je zarazna bolest kako u svijetu tako i kod nas. Uz edukaciju i cijepljenje, važan oblik sprječavanja zaraze je podizanje kvalitete i sigurnosti transfuzije krvi kao jedinstvenog oblika liječenja.

Krv je lijek koji nije moguće proizvesti na umjetan način. Odrasla osoba u svom organizmu ima približno 5 litara krvi koja je neophodna za normalno funkcioniranje organizma. Krv osigurava dovod kisika i hranjivih tvari u stanicu, a odstranjuje štetne i nepotrebne tvari i stoga je kao lijek nezamjenjiva. Tekući dio krvi čini krvna plazma koja se sastoji od vode, ugljikohidrata, masti, bjelancevina, hormona, minerala i vitamina (1). Stanični dio čine eritrociti, leukociti i trombociti.

Svaka krv je u osnovi zarazna te gotovo da nema krvi odrasle osobe u kojoj se ne nalaze aktivni ili latentni i replikativno sposobni organizmi. Postoji veliki broj uzročnika raznih zaraznih i krvlju prenosivih bolesti. Uzročnici zaraznih bolesti koji predstavljaju veliki javnozdravstveni problem su retrovirusi (najpoznatiji je virus humane imunodeficijencije – HIV) te virusi hepatitisa B (HBV) i C (HCV). Osim HBV-a i HCV-a, ostali virusi hepatitisa nisu posebno značajni u transfuzijskoj medicini, iako, vrlo rijetko, mogu biti uzrok zaraze. Serološke metode su nužne za postavljanje dijagnoze hepatitisa B, praćenje kliničkog tijeka bolesti, utvrđivanje težine i oblika bolesti, prognozu te praćenje protuvirusnog liječenja (1). U novije vrijeme uz standardnu serološku obradu krvi uključena je i molekularna dijagnostika. Više o serološkoj i molekularnoj dijagnostici HBV-a, kao i o učestalosti virusa u populaciji dobrovoljnih davatelja krvi (DDK) bit će prikazano u radu.

### 1.1. TRANSFUZIJA KRVI

Transfuzija krvi je rutinski medicinski postupak kojem se može pomoći bolesniku, a u nekim težim slučajevima spasiti mu život. Uobičajena je transfuzija darovateljeve krvi, a sve češće se koristi i transfuzija vlastite krvi (autologna transfuzija) koja je najsigurnija metoda, ali zahtijeva planiranje unaprijed te nije uvijek moguća (nesreće). Transfuzijom krvi prenosi se krv ili krvni produkti iz organizma davatelja u organizam primatelja. Svrha transfuzije krvi je nadomjestiti

krvne stanice ili krvne produkte koji su se izgubili tijekom teškog krvarenja operacija ili u bilo kojem slučaju velikog gubitka krvi.

Banke krvi skupljaju, testiraju, obrađuju i pohranjuju krv. Pažljivo testiraju svu doniranu krv zbog mogućih infektivnih agensa, poput virusa, jer bi njihova prisutnost mogla uzrokovati bolest. Davanjem krvi krive krvne grupe osobu se može zaraziti ili čak dovesti do smrti. Neki ljudi imaju alergijske reakcije, iako dobivena krv odgovara njihovoj vlastitoj krvi, stoga liječnik propisuje lijek kako bi se alergijske reakcije zaustavile.

Iako se sve krvi sastoje od osnovnih elemenata, one ipak nisu jednake. Postoje četiri različite osnovne krvne grupe koje su određene prisutnošću ili odsutnošću A i B antigena odnosno tvari koje mogu aktivirati imunološki sustav. To su krvne grupe A, B, AB i O. U krvnim bankama uzorak donacije krvi prolazi imunohematološko i serološko testiranje. U imunohematološko testiranje ubrajamo određivanje krvne grupe i Rh + K fenotipa (Kell) DDK, testiranje na neočekivana protutijela (TPNP) te određivanje prisutnosti određenog eritrocitnog antigena („tipiranje na specifični antigen“) (2).

Testiranje na krvlju prenosive bolesti uključuje serološko i molekularno testiranje uzorka pojedinačne donacije DDK na HBV, HCV, HIV1, u novije vrijeme i HIV2 te serološko testiranje na sifilis (anti-TP).

### **1.2. HEPATITIS B**

Hepatitis je upalna bolest jetara koja može dovesti do fibroze, ciroze i tumora/raka jetre. Ukoliko je imunološki sustav organizma dovoljno jak, bolest može biti eliminirana. Najčešći uzročnici hepatitisa su virusi, ali određene vrste hepatitisa mogu prouzročiti razne toksične tvari (alkohol) ili autoimune bolesti.

Postoji pet glavnih virusa hepatitisa koji se označavaju slovima od A do E, iako su poznati i hepatitis F, G i H. Poznato je da su hepatitis tipa A i tipa E uglavnom uzrokovani ingestijom kontaminirane vode ili hrane. Hepatitis B, C i D uglavnom se pojavljuju kao rezultat parenteralnog kontakta s inficiranim tjelesnim tekućinama. Za neke ljude hepatitis B je akutna ili kratkotrajna bolest, dok kod drugih može prijeći u kronični oblik uzrokujući dugotrajnu bolest. Rizik za povećanu infekciju povezana je s dobi: približno 90 % zaražene djece postaju kronično inficirani, u usporedbi sa 2 – 6 % odraslih. Kronični hepatitis može dovesti do

ozbiljnih zdravstvenih problema te je cijepljenje najbolji način sprječavanja hepatitis B virusne infekcije (3).

### 1.2.1. HEPATITIS B VIRUS

Hepatitis B je najrasprostranjeniji oblik hepatitisa u svijetu koji završava potpunim ozdravljenjem ili kroničnim oblikom bolesti (trajno oštećenje jetre). Uzročnik hepatitisa B je virus hepatitisa B (HBV) iz porodice Hepadnaviridae, roda Orthohepadnavirus. Njegova je građa vrlo kompaktna, sitan je i okruglog je oblika.

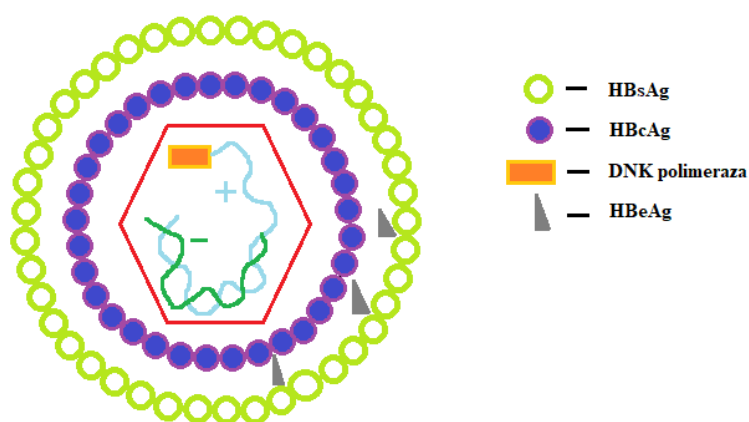
Hepatitis B virus sastoji se od:

1. Jezgrenog dijela – proteinska ljuska – HBcAg i DNK virusa, enzimi za replikaciju
2. Vanjskog omotača – površinski protein – HBsAg

Između vanjskog omotača i jezgre nalazi se HBeAg – „hepatitis B envelope antigen“ (hepatitis B antigen omotača) (4). Nukleokapsidni dio sastoji se od HBcAg i virusne HBV DNK s DNK polimerazom/reverznom transkriptazom. Protein jezgre koji slobodno cirkulira u serumu je HBeAg. U serumu se slobodno nalazi i HBV DNK i DNK polimeraza (Slika 1.).

Genom HBV sadrži 4 gena koji kodiraju 5 proteina:

1. S gen – kodira površinski S antigen
2. C gen – kodira jezgreni (sržni) antigen i e-antigen
3. P gen – kodira polimerazu
4. X gen – kodira X protein i aktivator je virusne RNK transkripcije



**SLIKA 1:** Hepatitis B Virus

### 1.2.2. OBLICI HEPATITISA

Hepatitis B virusna infekcija najčešće se javlja u akutnom i kroničnom, a rjeđe u okultnom obliku.

#### 1.2.2.1. AKUTNA INFEKCIJA

Akutna hepatitis B infekcija je u većini slučajeva samoizlječiva. Akutna se infekcija dijeli na dvije faze, inicijalnu i ikteričnu. Inicijalna faza je karakterizirana simptomima umora, gubitkom teka, bolovima u mišićima, povraćanjem i mučninama. Ti simptomi traju relativno kratko, do 2 tjedna. U tom je vremenu u krvi moguće dokazati visoki titar antigena HBsAg, HBeAg te HBV DNK, dok su bilirubin i ALT u granicama normale. U ikteričnoj fazi javlja se žutica te jako povišene vrijednosti serumskih aminotransferaza (ALT, AST) i bilirubina. Kada se aktivira imunološki sustav i odgovor na prisutnost viriona, broj viriona se smanjuje. Nemogućnost detektiranja HBsAg, normalizacija laboratorijskih nalaza te pojava protutijela na HBsAg, HBcAg i HBeAg ukazuje na oporavak zaražene osobe. Prisutnost anti-HBs protutijela ukazuje na stečenu imunost (5).

#### 1.2.2.2. KRONIČNA INFEKCIJA

Kronična infekcija je prisutna kod ljudi kojima je HBV pozitivan dulje od 6 mjeseci nakon prvih rezultata testa. Njihov imunološki sustav nije bio u mogućnosti eliminirati hepatitis B virus, te on ostaje u njihovoj krvi i jetri. Rizik razvijanja kronične hepatitis B virusne infekcije je usko vezana uz dob u kojoj je osoba prvi put došla u kontakt s virusom hepatitisa B. Većina ljudi nema nikakvih simptoma i hepatitis B može biti dijagnosticiran i desetljećima nakon prvog kontakta s virusom. Iako, samo saznanje kako je netko nositelj HBV-a može biti veliki šok, dobro je znati kako većina oboljelih može očekivati dugi život. Postoje razne terapije lijekovima koji kroničnu infekciju mogu držati pod kontrolom i spriječiti još veće uništavanje jetara (6).

### 1.2.2.3. OKULTNA INFEKCIJA

Prema definiciji, okultnu HBV infekciju (OBI) karakterizira prisutnost HBV DNK u krvi bez detektabilnog hepatitis B antigena (HBsAg). Kod bolesnika s okultnom infekcijom, razina virusnih čestica u serumu je niža od  $10^4$ . Najčešći razlozi okultne HBV infekcije su nereplikativna ili slabo replikativna faza HBV infekcije, razne mutacije virusa, virusna interferencija ili perzistencija nakon ozdravljenja (7). Okultnu HBV infekciju karakterizira razina HBV DNK niža od 200 IU/mL i može biti:

1. Razina HBV DNK niža od 200 IU/mL
  - a) Seropozitivan OBI (anti-HBc i/ili anti-HBs)
  - b) Seronegativan OBI (anti-HBc i anti-HBs negativan)
2. Visoka razina HBV DNK
 

Lažna („false“) OBI – infekcija s mutiranim S genom

Moguća je prisutnost zaraznih virusnih klonova (8, 9)

### 1.2.3. HEPATITIS B VIRUSNI MARKERI

Hepatitis B virusni markeri su skup testiranja na antigene odnosno protutijela HBV-a. Prisutnost odnosno odsutnost pojedinog antigena, odnosno specifičnog protutijela pokazuje fazu HBV infekcije kod DDK. Ukoliko je organizam nakon kontakta s HBV-om uspio stvoriti specifična protutijela i eliminirati virus odnosno spriječiti njegovu replikaciju, u serumu su prisutna protutijela na određene dijelove HBV-a. U tom slučaju infekcije više nema, a protutijela u serumu ukazuju na kontakt s HBV-om.

Različiti serološki markeri ili kombinacije markera koriste se kako bi se otkrile različite faze hepatitis B virusne infekcije. Također, pomoću njih se određuje ima li pacijent akutnu ili kroničnu HBV infekciju, je li imun na hepatitis B zbog prijašnje infekcije ili cijepljenja te je li osjetljiv na infekciju.

Hepatitis B virusni markeri su HBsAg, HBeAg, anti-HBs, anti-HBe i anti-HBc (10).

- HBsAg – marker trenutne infekcije, površinski hepatitis B antigen,
- HBeAg – marker aktivne infekcije, antigen omotača hepatitisa B,
- anti-HBc – marker sadašnje ili prošle infekcije, protutijelo na jezgri antigen,
- anti-HBs – marker imunosti, protutijelo je na površinski antigen,

- anti-HBe – marker neaktivnosti virusa, protutijelo je na antigen omotača hepatitisa B.

**Tablica 1.: Interpretacija rezultata seroloških hepatitis B testova (11)**

Serološki hepatitis B testovi	Rezultat	Interpretacija
HBsAg anti-HBc anti-HBs	Negativan Negativan Negativan	Osjetljiv
HBsAg anti-HBc anti-HBs	Negativan Pozitivan Pozitivan	Imun zbog preboljene infekcije
HBsAg anti-HBc anti-HBs	Negativan Negativan Pozitivan	Imun zbog cijepljenja protiv hepatitisa B
HBsAg anti-HBc anti-HBs IgM anti-HBc	Pozitivan Pozitivan Pozitivan Negativan	Akutna HBV infekcija
HBsAg anti-HBc anti-HBs IgM anti-HBc	Pozitivan Pozitivan Negativan Negativan	Kronična HBV infekcija
HBsAg anti-HBc anti-HBs	Negativan Pozitivan Negativan	Interpretacija nalaza nejasna, 4 mogućnosti: 1. Infekcija riješena 2. lažno pozitivan anti-HBc (iako je osjetljiv) 3. nizak nivo kronične infekcije 4. rješavanje akutne infekcije

Preuzeto iz 11. uz dozvolu autora.

### 1.3. PATOGENEZA

Virus hepatitisa B otkriven je u gotovo svakoj tjelesnoj tekućini zaražene osobe, a najčešće u krvi. Može se prenijeti spolnim odnosom sa zaraženom osobom, već korištenim ili nesterilnim iglama, nesterilnim medicinskim priborom koji je bio u kontaktu sa zaraženom osobom te s majke na dijete (2).

Hepatitis B virus ima kompleksni životni ciklus. Virus ulazi u stanicu jetre i transportira se u jezgru. Dolaskom u jezgru viralna se DNK transformira u kovalentno zatvorenu kružnu DNK („cccDNA“), koja služi kao uzorak za stvaranje novog hepatitisa B virusa. Novostvoreni HBV virus izlazi iz stanice sa stabilnom viralnom „cccDNA“ koja ostaje u jezgri i koja će zapravo pomoći u integriranju virusa u novu stanicu te isto tako stvarati nove hepatitisa B viruse. Iako se još u potpunosti ne razumije cijeli ciklus replikacije HBV-a, dijelovi replikativnog procesa su podložni pogreškama čime se stvaraju različiti genotipovi hepatitisa B virusa (4).

### 1.4. DIJAGNOSTIČKI PROZOR

Iako se čini sve kako bi se što prije saznalo nosi li netko virus hepatitisa B, uvijek postoji mogućnost prijenosa zaraze. Transfuzijom je moguće prenijeti zarazu u vrijeme dijagnostičkog prozora. Dijagnostički prozor, odnosno „Window period“, je vrijeme proteklo od infekcije do pozitivnog rezultata testiranja na HBV. Postoji razlika u trajanju „window perioda“ za serološka i za molekularna testiranja. Prosječni „window period“ za hepatitis B virus je 35 - 40 dana (u prosjeku 38 dana) za serološki test, a za molekularni ID-NAT test iznosi 15 dana (12).

### 1.5. PREVENCIJA I LIJEČENJE HBV INFEKCIJE

Prvi korak u prevenciji i liječenju hepatitisa B su mjere zaštite od infekcije i edukacija. U Republici Hrvatskoj zakonom je od 1999. godine propisano cijepljenje protiv virusa hepatitisa B u 6. razredu osnovne škole. Jedno su vrijeme cijepljena sva novorođena djeca (2007.). Međutim, zbog sve negativnijeg stava prema cijepljenju bilo koje vrste, danas se cijepi samo djeca majki pozitivnih na hepatitis B. Ne postoji specifična, niti 100 % učinkovita terapija u liječenju virusne infekcije hepatitisom B. Kod akutne infekcije 95 % osoba zaraženih virusom hepatitisa će se samoizlječiti, a kao odraz preboljele infekcije u organizmu će zaostati antitijela. Kod liječenja kronične infekcije koja je uzrokovana virusom hepatitisa B, koriste se lijekovi kako bi se kontroliralo razmnožavanje virusa u organizmu (lamivudin, adefovir, entekavir).

Kako bi liječenje virusne infekcije hepatitisa B bilo uspješno, važno je odlaziti redovito na kontrole, uzimati redovno terapiju i držati se savjeta liječnika (13).

## 1.6. EPIDEMIOLOGIJA

HBV infekcija ubraja se u najčešće perzistentne infekcije i najvažnija je zarazna bolest u svijetu. Trećina svjetske populacije dođe za vrijeme života u kontakt s HBV-om, 350 - 400 milijuna ljudi ima perzistentnu HBV infekciju, a 250 000 do 1,5 milijuna ljudi na godinu umire od kroničnih bolesti jetre koje su u vezi s HBV-om. Važnu ulogu u karcinogenezi imaju virusni čimbenici, genski čimbenici domaćina i čimbenici okoline. Virus je nađen u krvi, spermi, slini, fecesu, urinu, žuči, likvoru, znoju, majčinu mlijeku, suzama, vaginalnom sekretu, sinovijalnoj tekućini i u krvi pupkovine. Najčešći put prijenosa je parenteralni ili inaparentni parenteralni (krv i krvni pripravci, spolni kontakt, tetovaža, ovisnost o intravenskim drogama, bušenje ušiju, piercing, zajedničko korištenje pribora za osobnu higijenu i dr.), iznimno neparenteralni (ustanove za osobe sa smetnjama u razvoju, bliski kućni kontakti). U svijetu se razlikuju zone visoke prevalencije kroničnih nositelja (8 – 15 %) kao što su Azija, subsaharska Afrika, Južna i srednja Amerika (45 % svjetske populacije), zone srednje prevalencije (2 – 7 %) kao što su Hrvatska, neki dijelovi Rusije, granična euroazijska i azijsko-afrička područja (43 % svjetske populacije i zone niske prevalencije (1 – 2 %) kao što su SAD, Kanada, zemlje zapadne Europe (12 % svjetske populacije). Republika Hrvatska spada u zemlje niske (u nekim navodima srednje) prevalencije hepatitisa B i C (14). U svijetu 10 – 30 % infekcija HBV-om prelazi u perzistentnu infekciju, od čega je 40 % zdravih nositelja HbsAg-a, a 60 % su bolesnici s kroničnim hepatitisom. Do 50 % kroničnih hepatitisa može prijeći u cirozu, a od njih, 10 % se razvije u hepatocelularni karcinom (15). Postotak pozitivnih rezultata nakon nakon potvrdnog serološkog testiranja na hepatitis B virus kod DDK-a u HZTM-u za 2013. godinu iznosi 0,008 %, za 2014. godinu 0,008 % te za 2015. godinu iznosio je 0,006 % (16).



## 2. CILJEVI RADA

Ciljevi rada su:

1. Utvrditi broj stvarno pozitivnih uzoraka donacija nakon potvrđne serološke i molekularne dijagnostike (usporedba rezultata). Utvrditi podudarnost serološke i molekularne metode utvrđivanja infekcije HBV-om,
2. Utvrditi kojoj kategoriji hepatitis B virusne infekcije pripadaju pozitivni uzorci donacija (akutna ili kronična HBV infekcija, OBI ili davni kontakt s HBV-om),
3. Utvrditi broj trajno odgođenih dobrovoljnih davatelja krvi (novih i višestrukih),
4. Na temelju broja trajno odgođenih davatelja krvi utvrditi smanjenje mogućeg prijenosa HBV-a krvlju.

### 3. ISPITANICI I METODE

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

#### 3.1. ISPITANICI

Ispitanici su u ovom istraživanju dobrovoljni davatelji krvi koji su zadovoljili kriterije za darivanje krvi i koji su dali krv tijekom tri godine (1. 5. 2013. – 1. 5. 2016.). U istraživanju će biti korišteni rezultati obveznog probirnog serološkog testiranja krvi davatelja na HBV, odnosno na HBsAg, provedenog u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu KBC Osijek, Odjelu za serološku i imunohematološku dijagnostiku davatelja krvi. Također će biti korišteni rezultati potvrdnih testiranja pozitivnih i nejasnih rezultata probirnih testiranja kao i rezultati molekularnog ID-NAT i diskriminacijskog HBV (dHBV) testiranja dobiveni u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, Petrova 3, Zagreb.

Ispitanici koji sudjeluju u ovom istraživanju dolaze s područja pet županija: Osječko-baranjske, Brodsko-posavske, Požeško-slavonske, Virovitičko-podravske te Vukovarsko-srijemske. Od 1. 5. 2013. do 1. 5. 2016. godine prikupljeno je i testirano ukupno 80 228 donacija krvi.

#### DOBROVOLJNI DAVATELJI KRVI

Definiciju dobrovoljnog davatelja krvi odredila je Međunarodna udruga transfuziologa (ISBT), Svjetska zdravstvena organizacija (WHO), Međunarodni Crveni križ (IFCR) i Europsko vijeće (Council of Europe) te je prihvaćena u svim zemljama svijeta. Dobrovoljni davatelji krvi su osobe koje daruju krv, plazmu ili stanične dijelove i za to ne primaju nikakvu naknadu (novčanu) po načelu dobrovoljnosti, solidarnosti, besplatnosti i anonimnosti. Dobrovoljni davatelj krvi predstavlja aktivnog sudionika u liječenju bolesnika, odnosno on je aktivna veza između zdravog dijela društva i bolesnika. To su sve zdrave osobe od 18 do 65 godina za koje je liječničkim pregledom i laboratorijskim ispitivanjem utvrđeno da mogu dati krv. Prije darivanja krvi, davatelj mora ispuniti upitnik i dati točne informacije koje se od njega traže kako bi transfuzijsko liječenje njegovom krvlju bilo sigurno.

Muškarci mogu darivati krv četiri puta, dok žene krv mogu darivati tri puta godišnje. Davanje krvi ne šteti zdravlju, ako se provode svi postupci pri odabiru davatelja krvi. Zdrav organizam vrlo brzo i u potpunosti nadoknađuje darivanu krv. Ne uzrokuje naviku davanja, nema tjelesnih promjena niti posljedica za organizam. Darivanjem krv davatelj ne samo da pomaže drugima već kontrolira i vlastito zdravlje. Jedna darivana doza krvi sadrži 450 mL krvi. Najčešći način

davanja krvi je davanje jedne doze „pune“ krvi. To znači da se u specijalnu plastičnu vrećicu za uzimanje krvi izvadi krv u kojoj se nalaze svi njezini sastojci: eritrociti, trombociti i leukociti zajedno s krvnom plazmom.

Davanje „pune“ krvi traje 8 - 12 minuta. Fizikalnim postupcima, tj. posebnim centrifugiranjem, doza „pune“ krvi razdvaja se na sastavne dijelove koje nazivamo krvnim pripravcima: koncentrat eritrocita, koncentrat eritrocita sa smanjenim brojem leukocita, koncentrat trombocita, koncentrat trombocita sa smanjenim brojem leukocita, koncentrat leukocita, doza plazme koja može biti svježe smrznuta plazma (SSP) koja u sebi sadrži sačuvane faktore koagulacije te plazma za frakcije. Drugi načina davanja je uzimanje samo jednog ili više raznih krvnih sastojaka pomoću aparata kojeg nazivamo stanični separator (plazmafereza, trombafereza) (1).

## 3.2. METODE

U ovom će istraživanju biti korišteni podaci iz baze podataka e-Delphyn (nacionalni informatički program za transfuzijsku djelatnost u RH) u obliku rezultata obveznog serološkog testiranja krvi DDK-a i na HBsAg uporabom enzimskih imunotestova u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek, Odjela za serološku i imunohematološku dijagnostiku davatelja krvi. Isto tako, bit će korišteni rezultati potvrdnih seroloških te probirnih i potvrdnih molekularnih testiranja izvršenih u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, Petrova 3, Zagreb, Odjelu za dijagnostiku krvlju prenosivih bolesti, Odsjeku za potvrdno testiranje i Odjelu za molekularnu dijagnostiku, Odsjeku za NAT testiranja davatelja krvi. Serološko potvrdno testiranje krvi na HBV obuhvaća enzimске imunotestove različitih proizvođača na HBsAg te panel HBV markera.

Molekularna dijagnostika DDK će biti temeljena na rezultatima Procleix Ultrio Plus testa (ID-NAT) testiranog na aparaturi Proclix TIGRIS System te diskriminacijskih testova: diskriminacijski HBV test, diskriminacijski HCV test te diskriminacijski HIV1 test.

### 3.2.1. SEROLOŠKA DIJAGNOSTIKA

U serološkom testiranju hepatitisa B upotrebljava se test za dokazivanje površinskog antigena hepatitisa B (HBsAg). S obzirom na sklonost HBV-a mutacijama kao i u slučajevima rane akutne faze hepatitisa B („Window period“) zbog nemogućnosti detekcije vrlo malih količina

virusa te kod OBI-a gdje se replikacija virusa odvija u jezgri hepatocita te u serumu nema prisutnog HBsAg-a, serološka dijagnostika nije dovoljna. Za kompletnu standardnu dijagnostiku od 1. 5. 2013. uvedeno je i molekularno testiranje (ID-NAT test). U daljnjoj će se dijagnostici koristiti i potvrdni serološki testovi u koje spadaju enzimski testovi za HBsAg te panel HBV markera.

#### 3.2.1.1. POVRŠINSKI ANTIGEN HEPATITISA B (HBsAg)

Probirno serološko testiranje na HBsAg obavlja se trima testovima:

1. HBsAg 3.0 Murex, proizvođača DiaSorin
2. Enzygnost HBsAg 6.0, proizvođača Siemens
3. Monolisa HBsAg Ultra, proizvođača Bio-Rad

#### **HBsAg 3.0, Murex**

##### OSJETLJIVOST

Ukupno 630 uzoraka pacijenata koji boluju od akutne i kronične infekcije hepatitisom B testirani su Murex HBsAg testom (verzija 3). Svih 630 uzoraka potvrđeni su alternativnim imunotestovima za HBsAg, te je rezultat pozitivan u oba testa. Osjetljivost za ovu populaciju uzoraka je 100 %. Dodatnih šest uzoraka pacijenata koji su inficirani mutiranim oblikom hepatitisa B, potvrđeni DNK sekvenciranjem također su testirani Murex HBsAg testom i svi su uspješno detektirani.

##### SPECIFIČNOST

Murex HBsAg test korišten je u studiji gdje je pregledano ukupno 12 330 rutinskih uzoraka donatora. Specifičnost se procjenjuje na 99,97 % (12 326/12 330) (17).

#### **Enzygnost HBsAg 6.0, Siemens**

##### OSJETLJIVOST

Visoko osjetljivi screening testovi na hepatitis B površinski antigen (HBsAg) ključni su za učinkovito izbjegavanje HBV infekcija povezanih s transfuzijom. Visoka specifičnost treba smanjiti ponovno ispitivanje i dodatne napore za testiranje, kako bi se izbjeglo nepotrebno

uništavanje krvi. Novi Enzygnost HBsAg 6.0 test dizajniran je u skladu sa stalno rastućim zahtjevima. Da bi se utvrdili podatci o osjetljivosti i specifičnosti Enzygnost HBsAg 6.0, Europska multicentrična studija provedena je na 13 studijskih stranica. Rezultati osjetljivosti uspoređeni su s bivšom test verzijom Enzygnost HBsAg 5.0. Enzyngost HBsAg 6.0 je test s najvišom osjetljivošću za detekciju rane HBV infekcije i HBsAg-a. Osjetljivost je 100 %.

#### SPECIFIČNOST

Specifičnost Enzygnost HBsAg 6.0 je 99,92 % i 99,87 % za uzorke plazme i seruma. (18).

#### **Monolisa HBsAg Ultra, Bio-Rad**

Monolisa HBsAg Ultra, Bio-Rad je enzimski imunotest temeljen na principu „sandwich“ metode. Koristi monoklonalna mišja i poliklonalna kozja protutijela izabrana prema njihovoj mogućnosti vezanja za različite podtipove HBsAg i najveći dio varijabilnih HBV sojeva.

#### OSJETLJIVOST

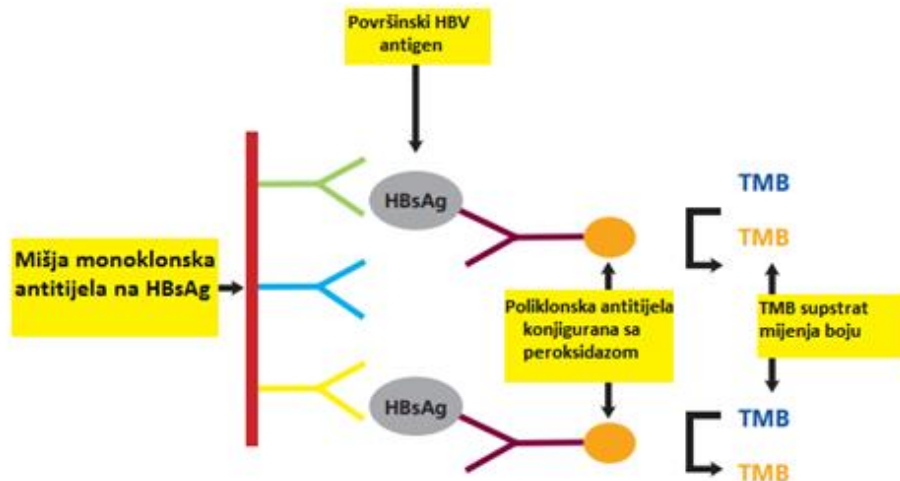
Granica osjetljivosti testa je ispod 0,060 ng/mL HBsAg-a, a granica detekcije je procijenjena na manje od 0,130 IU/mL. Studija osjetljivosti je pokazala 100 % osjetljivost kod 428 uključena pozitivna uzorka kroničnog ili akutnog hepatitisa B.

#### SPECIFIČNOST

Specifičnost na ukupno 9894 slučajno odabrana DDK iznosila je 99,94 % (9887/9894) (19).

#### 3.2.1.2. PRINCIP SEROLOŠKOG HBsAg TESTA

Mješavina mišjih monoklonalnih protutijela protiv HBsAg-a kojima su obložene testne jažice na sebe veže HBsAg koji se nalazi u uzorku. Na novonastali spoj Ag/At vežu se poliklonalna protutijela koja su obilježena peroksidaza enzimom. Dodavanjem TMB supstrata aktivira se enzim i razvija se boja. Reakcija se zaustavlja dodavanjem sumporne kiseline. Intenzitet obojenja upravo je proporcionalan koncentraciji HBsAg u uzorku.



Slika 2. Princip HBsAg testa (11)

Preuzeto iz 11. uz dozvolu autora.

### 3.2.1.3. INTERPRETACIJA REZULTATA PROBIRNOG SEROLOŠKOG HBsAg TESTA

DDK koji su u inicijalnom testiranju bili reaktivni retestirani su istim testom u duplikatu. Ukoliko je rezultat obaju retestiranja nereaktivan, konačni rezultat testiranja je negativan. Ukoliko je retestiranje u duplikatu bilo oba puta reaktivno ili jedan puta reaktivno, a drugi puta nereaktivno, konačni rezultat je pozitivan te se uzorak donacije šalje na potvrdno testiranje u HZTM (12).

### 3.2.1.4. POTVRDNI SEROLOŠKI TESTOVI NA HBV

Potvrdni serološki testovi temeljeni su na istom principu kao i probirni, međutim, njihova je specifičnost puno veća. Ta mu karakteristika daje sposobnost razlučivanja stvarno pozitivnog od lažno pozitivnog rezultata. Potvrdna HBV testiranja obuhvaćaju testove na HBsAg raznih proizvođača (kao i onih kojima je dobiven reaktivan rezultat) kao i kompletan panel HBV markera. Usporedbom i interpretacijom dobivenih rezultata, a prema priručniku: „Postupak evaluacije doza i davatelja krvi prema rezultatima NAT i seroloških testova u transfuzijskoj djelatnosti RH“ u kojem se nalaze preporuke i algoritam interpretacije rezultata, vrši se krajnja interpretacija seroloških rezultata. Moguće je odrediti o kojem se stupnju hepatitisa B radi. Je li u pitanju nespecifična reakcija, eventualni davni kontakt s HBV-om (pozitivna protutijela na

HBV). Moguće je i jasno negativan rezultat koji isključuje HBV ili pozitivan rezultat koji serološki potvrđuje prisutnost HBV-a (12). Stupnjevi hepatitis B virusne infekcije opisani su u Tablici 1.: Interpretacija rezultata seroloških hepatitis B testova (20).

#### 3.2.2. MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA

Prema svjetskim standardima, od 2013. godine u Republici Hrvatskoj (RH) u svim donacijama krvi uz serološku dijagnostiku, rutinski se radi obvezno probirno molekularno testiranje: „Individual donor nucleic acid amplification test“ (ID-NAT). Taj je trostruki molekularni test u mogućnosti nadomjestiti određena ograničenja serološke dijagnostike. Ukoliko je ID-NAT trostruki test pozitivan, rade se diskriminacijski testovi kojima se dokazuje koji je od genoma prisutan u uzorku (HBV DNK, HCV RNK, HIV1 RNK). ID-NAT test je temeljen na principu transkripcijom posredovane amplifikacije (TMA). Karakteristike ID-NAT-a su 100 % specifičnost i mogućnost otkrivanja vrlo malih količina virusnog genoma, a skraćanjem „window perioda“, taj je test u mogućnosti puno ranije otkriti uzročnika zaraze u krvi u odnosu na serološku dijagnostiku. Mutirani oblici HBV-a nemaju utjecaja na detekciju jer se dokazuje sama DNK virusa, a ne njegov površinski antigen. U toj sposobnosti kao i u sposobnosti detekcije vrlo malih količina virusa (test prepisuje i amplificira virus do mogućnosti detekcije), kriju se ogromne prednosti molekularnog ID-NAT testiranja. Još jedna velika prednost testa je smanjen „WP“ sa prosječno 38 dana kod serološkog testiranja na svega 15 dana kod ID-NAT testiranja (12).

##### 3.2.2.1. INDIVIDUALNI TEST ZA DOKAZIVANJE NUKLEINSKIH KISELINA

###### „INDIVIDUAL DONOR-NUCLEIC ACID TESTING“ (ID-NAT)

ID-NAT je molekularna tehnika koja služi za probir krvnih donacija koje u sebi sadrže virusnu DNK ili RNK. Služi u svrhu smanjenja rizika prijenosa bolesti transfuzijom. Počela se koristiti u razvijenim zemljama u kasnim 90-im i ranim 2000-im godinama. Trenutno je u 27 zemalja uveden NAT za HBV. NAT je vrlo osjetljiva metoda i specifična jer u 100 % slučajeva otkriva virusne nukleinske kiseline. ID-NAT je test baziran na amplifikaciji ciljanih regija viralne ribonukleinske kiseline ili deoksiribonukleinske kiseline, te ih otkriva/detektira ranije nego bilo koja druga metoda probira. Također, molekularna metoda je korisna pri rješavanju lažno

reaktivnih donacija kod seroloških metoda koje su važne za obavještanje donora i savjetovanje (21).

Na temelju nalaza HBV markera dobiva se informacija o stadiju hepatitisa B, a prema prisutnim protutijelima, odnosno HBsAg-u, govorimo o akutnom ili kroničnom hepatitisu, postoji li serokonverzija ili ne. Uz pomoć rezultata ID-NAT-a i dHBV-a uz dijagnostiku navedenih stanja, može se detektirati prisutnost okultne hepatitis B virusne infekcije (OBI). Test je i vrlo ekonomičan jer može otkriti prisutnost bilo koje nukleinske kiseline u jednom testiranju. Ukoliko je ID-NAT test reaktivan, pristupa se diskriminacijskim testiranjima (dHBV, dHCV, dHIV1) zbog utvrđivanja vrste nukleinske kiseline. Ukoliko je pozitivan dHBV test, sa sigurnošću možemo reći da se radi o HBV DNK u uzorku.

Kombinacijom seroloških i molekularnih testova dobivena je specifičnija i bolja detekcija HBV u DDK-u.

#### 3.2.2.2. PRINCIP INDIVIDUALNOG TESTA ZA DOKAZIVANJE NUKLEINSKIH

##### KISELINA

ID-NAT test se radi na aparatu Procleix Tigris System proizvođača Grifols, Barcelona, Španjolska, na principu transkripcijski posredovane amplifikacije (TMA). Test se sastoji od nekoliko faza: pripreme uzorka, ciljne amplifikacije HIV1-RNK, HCV-RNK i HBV-DNK pomoću TMA metode i detekcije amplikona koji se odvijaju u jednoj reakcijskoj tubi. Važan korak u pripremi uzorka čini denaturacija proteina uz pomoć detergenta. On služi za rastapanje virusne ovojnice, denaturaciju proteina i oslobađanje virusne RNK ili DNK. TMA se koristi za umnažanje dijelova DNK. Reverzna transkriptaza (RT) kreira kopiju DNK (cDNA) HBV-a. RNK polimeraza zatim potiče transkripciju sintetizirajući RNK. Neki od novonastalih amplifikacijskih RNK produkata ulaze ponovno u proces TMA i služe kao podloga za novi ciklus amplifikacije. Rezultat amplifikacije može biti više milijardi kopija u vremenu manjem od jednog sata. Akridinij-esterom (AE) označene probe specifično hibridiziraju na amplifikacijske produkte. Probe unutarnje kontrole i virusno specifične probe različito su označene. Test hibridizacijske zaštite selektivno inaktivira AE oznaku na nehibridiziranim probama kako bi umanjio pozadinski signal i istaknuo samo hibridizirane probe. Tehnologija dvostrukog kinetičkog testa („Dual kinetic assay – DKA“) omogućuje razlikovanje duljine



signala između kratkotrajnog signala unutarnje kontrole i dugotrajnog signala virusne označene DNK (22).

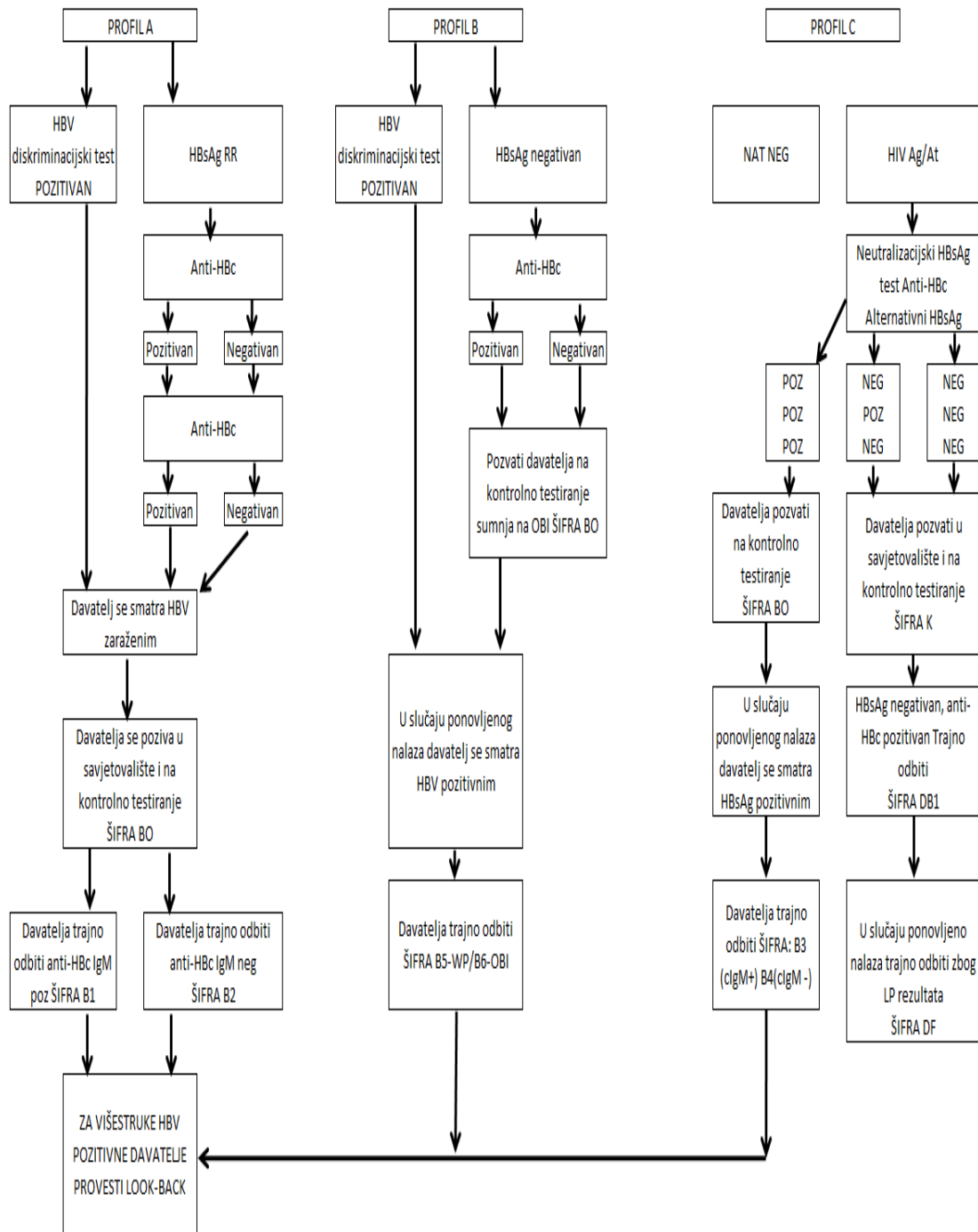
#### 3.2.2.3. INTERPRETACIJA INDIVIDUALNOG TESTA ZA DOKAZIVANJE

##### NUKLEINSKIH KISELINA

Molekularno se testiranje obavlja u HZTM-u, Odsjeku za NAT testiranje davatelja krvi, Odjela za molekularnu dijagnostiku. Uzorci prikupljeni u KZTM KBC Osijek ili na područjima koje pokriva Klinički zavod, svakodnevno se šalju brzom poštom u HZTM. Testiranje i interpretaciju rezultata testiranja ID-NAT-a obavlja HZTM. Ukoliko je inicijalni rezultat testiranja ID-NAT-a reaktivan, retestiranje se, identično serološkom, obavlja u duplikatu. Ukoliko je rezultat ID-NAT-a oba puta nereaktivan, zaključni NAT je negativan. Ukoliko je retestiranje oba puta reaktivno ili jedan puta reaktivno, a drugi puta nereaktivno, zaključni NAT je pozitivan. Interpretacija ID-NAT testiranja obavlja se prema algoritmu koji je propisao HZTM, Petrova 3 Zagreb: Postupak evaluacije doza i davatelja krvi prema rezultatima NAT i seroloških testova u transfuzijskoj djelatnosti RH (12).

#### 3.2.2.4. DISKRIMINACIJSKI HBV TEST (dHBV)

Ukoliko je zaključni rezultat ID-NAT testa pozitivan, potrebno je učiniti diskriminacijske testove, diskriminacijski HBV (dHBV), diskriminacijski HCV (dHCV) i diskriminacijski HIV1 (dHIV1) kako bismo potvrdili koja je nukleinska kiselina prisutna u uzorku. Diskriminacijski testovi imaju isti princip TMA kao i triplex ID-NAT test, osim što se u njima događa amplifikacija i detekcija samo jedne nukleinske kiseline. Interpretacija rezultata diskriminacijskih rezultata vrlo je jednostavna. Diskriminacijski testovi sa 100 % osjetljivošću i specifičnošću detektiraju nukleinsku kiselinu. Prema tome, negativan rezultat dHBV testa sigurno znači da se u određenom uzorku ne nalazi HBV DNK, a pozitivan rezultat sa sigurnošću znači prisutnost HBV DNK u uzorku.



Slika 3: Algoritam evaluacije davatelja s reaktivnošću HBV-NAT i/ili HBsAg testa (11)

Preuzeto iz 11. uz dozvolu autora.

#### 3.2.2.5. PRIVREMENA ILI TRAJNA ODGODA DDK-a

DDK čiji su rezultati suspekti ili trenutno nije moguća jasna detekcija virusa na temelju dobivenih rezultata, pozivaju se na kontrolna testiranja nakon određenog vremena. Nerijetko kod DDK u rezultatima možemo dobiti reaktivnost u jednom testu koja je nakon testiranja potvrdnim testovima i ID-NAT-om rezultatski negativna. Takvi rezultati govore o nespecifičnoj reakciji određenih komponenti u uzorku, s ponuđenim specifičnim protutijelima u testu koja nije povezana sa HBV-om. Kod DDK koji imaju pozitivan rezultat bilo u serološkom i/ili ID-NAT-u i dHBV testu, prema algoritmima propisanim u priručniku Postupak evaluacije doza i DDK prema rezultatima NAT-a i seroloških testova u transfuzijskoj djelatnosti RH, šalje se obavijest o trajnoj odgodi davatelja. DDK više ne može biti dobrovoljni davatelj krvi ili organa. Ta obavijest govori DDK-u da je u njegovoj krvi pronađen HBV te mu se preporučuju daljnji postupci (12).

### 3.3. KRVNI PRIPRAVCI

Iz svake donacije krvi može se preradom napraviti nekoliko vrsta krvnih pripravaka. Time se postiže učinak kod primatelja krvi jer mu se daju samo oni pripravci koji su mu zaista potrebni. Ostali pripravci prosljeđuju se drugim primateljima, prema potrebi. Isto tako, vrlo je važno ekonomično koristiti svaku donaciju krvi jer, iako je ona „besplatna“ odnosno DDK ne dobiva nikakvu novčanu naknadu za nju, samo prikupljanje, testiranje i obradu prikupljene donacije, ima cijenu koja nije mala. Ekonomično postupanje donacijom postiže se proizvodnjom većeg broja pripravaka iz nje. Upravo iz tog razloga važno je, ukoliko je neka od donacija suspektna ili reaktivna na HBsAg ili na bilo koji učinjeni test, sve pripravke koji su iz nje proizvedeni povući iz banke pripravaka te ih propisno izdvojiti i uništiti. Za svaku donaciju i njen pripravak postoji pisani trag o uzimanju, testiranju, proizvodnji, skladištenju, izdavanju bolesniku ukoliko je sukladna odnosno izdvajanju te propisnom uništavanju u slučaju nesukladnosti (jedna od njih je i pozitivan serološki ili ID-NAT test). Svi su ti podatci evidentirani u programu jedinstvenom za transfuzijsku djelatnost u RH nazvanom e-Delphyn.

### 3.3.1. VRSTE KRVNIH PRIPRAVAKA

#### KONCENTRAT ERITROCITA (KE)

Krvni pripravak pripremljen izdvajanjem najvećeg dijela plazme (200 - 250 mL) iz centrifugirane doze krvi; KE ima isti volumen eritrocita kao i puna krv, time i isti kapacitet prijenosa kisika kao i puna krv, ali u značajno manjem volumenu. Indikacije: korekcija anemija.

#### KONCENTRAT ERITROCITA SA SMANJENIM BROJEM LEUKOCITA (KESBL)

Koncentrat eritrocita sa smanjenim brojem leukocita ili koncentrat eritrocita siromašan leukocitima pripremljen je s posebnim filterima koji odstranjuju oko 99,9 % leukocita i 85 % trombocita. Primjenjuju se u sprječavanju imunizacije s HLA antigenima i prevenciju posttransfuzijskih nehemolitičkih reakcija.

#### SVJEŽE SMRZNUTA PLAZMA (SSP)

SSP je plazma dobivena od jednog davatelja i smrznuta na temperaturi nižoj od  $-30^{\circ}\text{C}$  ne kasnije od 6 sati poslije uzimanja krvi. Sadrži sve faktore zgrušavanja, posebno labilne faktore V. i VIII. Koristi se za liječenje stanja s nedostatkom faktora zgrušavanja: hemofilije A, von Willebrandove bolesti i hipofibrinogenemije.

#### PLAZMA ZA FRAKCIONIRANJE

Plazma dobivena od jednog davatelja, odvojena i smrznuta nakon 6 sati od uzimanja. U sebi ne sadrži sve faktore zgrušavanja, posebno labilne faktore V. i VIII. Šalje se u specijaliziranu ustanovu na frakcioniranje. Frakcioniranje plazme podrazumijeva višestruko taloženje zbog promjene koncentracije alkohola, ionske koncentracije i temperature. Iz plazme se izdvajaju pojedini njezini sastojci u visokim koncentracijama i s očuvanom djelotvornošću.

#### „BUFFY COAT“ - GRANIČNI SLOJ IZMEĐU STANICA I PLAZME

Dobiva se spontanom sedimentacijom ili centrifugiranjem pune krvi uzete s antikoagulantnom otopinom. Sadrži eritrocite, plazmu i veliki postotak leukocita i trombocita.

#### „PUNA KRV“

Krv koja sadrži 450 mL krvi pomiješane sa 63 mL antikoagulantne otopine. Primjenjuje se za transfuziju ili daljnju preradu u krvne pripravke. Indikacije: hipovolemija udružena s kliničkim znakovima smanjenog oksigenacijskog kapaciteta. U praksi se u KZTM KBC-u Osijek ne upotrebljava puna krv.

**KONCENTRAT TROMBOCITA SA SMANJENIM BROJEM LEUKOCITA DOBIVEN  
TROMBAFEREZOM (KTSBL dobiven trombaferezom)**

Koncentrat trombocita dobiven od jednog davatelj pomoću staničnog separatora; volumen 100 - 200 mL. Sadrži  $3 - 5 \times 10^{11}$  trombocita, što odgovara broju 6 - 8 doza koncentrata trombocita izdvojenih diferencijalnim centrifugiranjem pune krvi (20).

**3.4. 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

U Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek, Odjelu za serološku i imunohematološku dijagnostiku davatelja krvi, od 1. 5. 2013. do 1. 5. 2016., probirnim serološkim enzimskim HBsAg imunotestom testirano je ukupno 80 228 uzoraka donacija krvi dobrovoljnih darivatelja krvi. Rezultati inicijalnog testiranja na HBsAg kao i rezultati potvrdnog testiranja opisani su u Tablici 2.

**Tablica 2. Broj serološki suspektnih i stvarno pozitivnih donacija krvi nakon potvrdnog testiranja**

RAZDOBLJE	UKUPAN BROJ DDK*	BR. SEROLOŠKI SUSPEKTVNIH I REAKTIVNIH DDK*	BROJ SEROLOŠKI HBsAg REAKTIVNIH NAKON PT†	BROJ SEROLOŠKI REAKTIVNIH PROTUTIJELA NAKON PT†	UKUPNO	SEROLOŠKI REAKTIVNI DDK* NA BROJ TESTIRANIH PT† U %	SEROLOŠKI REAKTIVNI DDK* NA UKUPAN BR. DDK U %
1.5.2013. – 30.4.2014.	23400	26	2	4	6	23,08	0,026
1.5.2014. – 30.4.2015.	27448	24	2	1	3	12,50	0,011
1.5.2015. – 30.4.2016.	29380	48	5	4	9	18,75	0,031
UKUPNO	80228	98	9	9	18	18,37	0,023

\* DDK – Dobrovoljni davatelji krvi

† PT – Potvrdno testiranje

Usporedbom broja serološki suspektnih i reaktivnih (ukupno) sa brojem serološki HBsAg reaktivnih nakon PT ( $p > 0,950$ ; Fisherov egzaktni test) i sa brojem serološki reaktivnih protutijela nakon PT ( $p = 0,545$ ; Fisherov egzaktni test) kroz tri razdoblja nije pokazala značajna odstupanja. Također niti usporedbom između broja serološki HBsAg reaktivnih nakon PT i broja serološki reaktivnih protutijela nakon PT nije nađena značajna razlika kroz tri promatrana razdoblja ( $p = 0,689$ ; Fisherov egzaktni test) (Tablica 2).

Svim prikupljenim donacijama uz probirno serološko testiranje obvezno je i molekularno testiranje u obliku ID-NAT-a. Tablica 3. prikazuje ukupan broj ID-NAT pozitivnih donacija krvi.

**Tablica 3. Ukupan broj pozitivnih donacija krvi pomoću individualnog testa za dokazivanje nukleinskih kiselina**

RAZDOBLJE	UKUPAN BROJ DDK*	BR. ID-NAT <sup>†</sup> REAKTIVNIH DDK* (A)	BR. ID-NAT <sup>†</sup> POZITIVNIH OBI <sup>‡</sup> (B)	UKUPNO (A+B)	A+B NA UKUPAN BROJ DDK* U %
1.5.2013. – 30.4.2014.	23400	2	5	7	0,030
1.5.2014. – 30.4.2015.	27448	2	1	3	0,011
1.5.2015. – 30.4.2016.	29380	5	2	7	0,024
UKUPNO	80228	9	8	17	0,021

\* DDK – Dobrovoljni davatelji krvi

<sup>†</sup> ID-NAT – Individualni test za dokazivanje nukleinskih kiselina

<sup>‡</sup> OBI – Okultna hepatitis B virusna infekcija

Usporedbom broja ID-NAT reaktivnih DDK i broja ID-NAT pozitivnih OBI nije nađena značajna razlika kroz tri promatrana razdoblja ( $p=0,365$ ; Fisherov egzaktni test) (Tablica 3).

S obzirom na različite oblike hepatitis B virusne infekcije: akutna, kronična, okultna te kontakt sa HBV-om, Tablica 4. prikazuje klasifikaciju DDK prema obliku infekcije.

**Tablica 4. Podjela pozitivnih donacija krvi prema kategoriji HBV infekcije**

RAZDOBLJE	AKUTNI HEPATITIS B (A)	KRONIČNI HEPATITIS B (B)	OKULTNA HEPATITIS B VIRUSNA INFEKCIJA (C)	DAVNI KONTAKT S HEPATITISOM B (D)	UKUPNO DDK* (A+B+C+D)	UKUPAN BROJ DDK*	% UKUPNO DDK* (A+B+C+D) NA UKUPAN BROJ DDK*
1.5.2013. – 30.4.2014.	0	2	5	4	11	23400	0,047
1.5.2014. – 30.4.2015.	0	2	1	1	4	27448	0,015
1.5.2015. – 30.4.2016.	0	5	2	4	11	29380	0,037
UKUPNO	0	9	8	9	26	80228	0,032

\* DDK – Dobrovoljni davatelji krvi

Podjela pozitivnih donacija krvi prema kategoriji HBV infekcije podjednaka je kroz sva tri promatrana vremenska razdoblja ( $p = 0,597$ ; Fisherov egzaktni test) (Tablica 4).

Uz podjelu DDK-i prema vrsti HBV infekcije, u ovom istraživanju značajna je i pripadnost davatelja kategorijama višestrukih ili novih DDK, što prikazuje Tablica 5.

**Tablica 5. Podjela trajno odgođenih DDK-a prema kategoriji hepatitisa B i broju darivanja krvi**

	NOVI DDK*	Višestruki DDK*	UKUPNO	% NA UKUPAN BROJ DDK*
AKUTNI HEPATITIS B	0	0	0	0
KRONIČNI HEPATITIS B	9	0	9	0,011
KONTAKT SA HBV †	2	7	9	0,011
OBI ‡	1	7	8	0,01
UKUPNO	12	14	26	0,032

\* DDK – Dobrovoljni davatelji krvi

† HBV – Hepatitis B virus

‡ OBI – Okultna hepatitis B virusna infekcija



Značajna je razlika između novih DDK i višestrukih DDK prema kategoriji hepatitisa uz  $p < 0,001$  (Fisherov egzaktni test). Najveća je razlika u kategoriji kroničnog hepatitisa (Tablica 5).

Uz vrste HBV infekcije, pripadnosti kategorijama višestrukih i novih DDK-i, važna je i spolna pripadnost. Tablica 6. prikazuje pripadnost kategorijama višestrukih i novih davatelja, te njihov spol.

**Tablica 6. Ukupan broj trajno odgođenih prema spolu i broju darivanja krvi**

	NOVI DDK*	VIŠESTRUKI DDK*	UKUPAN BROJ TRAJNO ODGOĐENIH DDK*	% NA UKUPAN BROJ DDK* (80228)
MUŠKARCI	12	13	25	0,031
ŽENE	0	1	1	0,001
UKUPNO	12	14	26	0,032

\* DDK – Dobrovoljni davatelji krvi

Usporedbom prema spolu nije nađena značajna razlika između novih DDK i višestrukih DDK uz  $p > 0,950$  (Fisherov egzaktni test). Muških davatelja je daleko više, međutim u omjeru ih je podjednako novih i višestrukih DDK među muškacima odnosno među ženama (Tablica 6).

S obzirom na činjenicu da se iz jedne donacije krvi radi više krvnih pripravaka, Tablica 7. prikazuje broj proizvedenih krvnih pripravaka prema razdobljima.

**Tablica 7. Prikaz proizvedenih krvnih pripravaka prema vrsti pripravka i razdoblju priprave**

RAZDOBLJE	BROJ KRVNIH PRIPRAVAKA							UKUPNO KRVNIH PRIPRAVAKA
	KONCENTRAT ERITROCITA	KESBL*	SVJEŽE SMRZNUTA PLAZMA	PLAZMA ZA FRAKCIJONIRANJE	BC†	PUNA KRV	KTSBL‡	
1.5.2013. – 30.4.2014.	14978	7371	20507	1911	21819	838	485	67909
1.5.2014. – 30.4.2015.	945	25451	21034	5402	26273	930	588	80623
1.5.2015. – 30.4.2016.	0	28152	21957	6195	26663	832	683	84482
UKUPNO	15923	60974	63498	13508	74755	2600	1756	<b>233014</b>

Ukupan broj donacija = 80228

\*KESBL – Koncentrat eritrocita sa smanjenim brojem leukocita (filtrirani eritrociti)

† „Buffy Coat“ – Granični sloj između staničnog dijela krvi i plazme, bogat leukocitima i trombocitima

‡ KTSBL – Koncentrat trombocita sa smanjenim brojem leukocita dobiven trombaferozom

Od ukupno 26 trajno odgođenih donacija proizvedeno je 76 krvnih pripravaka. U tablici 8. prikazana je raspodjela nesukladnih i uništenih krvnih pripravaka prema vrsti pripravka.

**Tablica 8. Prikaz broja nesukladnih donacija prema vrsti krvnog pripravka**

RAZDOBLJE	KONCENTRAT ERITROCITA	KESBL*	SVJEŽE SMRZNUTA PLAZMA	PLAZMA ZA FRAKCIJONIRANJE	BUFFY COAT†	PUNA KRV	UKUPNO	% na ukupan broj krvnih pripravaka‡
1.5.2013. – 30.4.2014.	11	0	10	1	11	0	33	0,014
1.5.2014. – 30.4.2015.	0	3	2	1	3	1	10	0,004
1.5.2015. – 30.4.2016.	0	11	10	1	11	0	33	0,014
UKUPNO	11	14	22	3	25	1	<b>76</b>	0,032

\* KESBL – Koncentrat eritrocita sa smanjenim brojem leukocita (filtrirani eritrociti)

† „Buffy Coat“ – Granični sloj između staničnog dijela krvi i plazme, bogat leukocitima i trombocitima

‡ Ukupan broj krvnih pripravaka = 233014

## 5. RASPRAVA

Nakon provedenog istraživanja od 1. 5. 2013. do 1. 5. 2016. godine, uz pomoć dobivenih rezultata, dokazana je prisutnost HBV-a u populaciji DDK-a. Probirnim serološkim testiranjem na HBsAg prevalencija suspektnih i reaktivnih DDK u prosjeku iznosi 0,12 %, dok je potvrдно serološko testiranje suspektnih i pozitivnih DDK-a na HBsAg dalo manji broj stvarno reaktivnih rezultata na prisutnost HBV-a, svega 0,002 %. Razliku u rezultatima možemo objasniti osjetljivošću probirnih i specifičnošću potvrđnih testova. Svrha probirnog testiranja nije izdvajanje samo reaktivnih donacija, već i onih s nejasnim rezultatima kako bi se takve donacije uklonile iz baze raspoloživih donacija za uporabu.

Potvrдно serološko testiranje služi za potvrdu na HBsAg stvarno reaktivnih donacija odnosno ukoliko se radi o pozitivnim protutijelima na HBsAg (markeri HBV-a), dokaz davnog kontakta s HBV-om. U našem slučaju bilo je 9 kontakata s HBV-om.

Niti jedna akutna infekcija niti dijagnostički prozor nisu bili dokazani, iako ID-NAT test ima dvije velike prednosti: prva je mogućnost detekcije virusa odnosno njegove HBV DNK u kraćem razdoblju nego serološkim testovima, a druga je da su njegova specifičnost i osjetljivost 100 %. To znači da on može dokazati HBV DNK već nakon 15-ak dana od kontakta s virusom, dok za serološko testiranje dijagnostički prozor traje u prosjeku 38 dana.

Kod stvarno reaktivnih donacija koje imaju pozitivan HBsAg test, rezultati probirnog i potvrđnog serološkog testiranja podudaraju se s rezultatima ID-NAT testa, u našem slučaju radi se o 9 DDK-a. Međutim, probirna serološka testiranja ne mogu detektirati HBV u fazi dijagnostičkog prozora, niti vrlo male količine virusa (OBI), tako da je ID-NAT test bio presudan u dokazivanju okultne hepatitis B infekcije. U našem slučaju bilo ih je 8. Tu je istaknuta važna karakteristika ID-NAT testa, a to je mogućnost amplifikacije i detekcije vrlo malih količina virusa.

Kombinacijom serološkog probirnog i potvrđnog testiranja i ID-NAT probirnog i dHBV potvrđnog testiranja, utvrđeno je da ima 8 okultnih hepatitis B infekcija. To je značajno, jer okultne hepatitis B virusne infekcije nisu mogle biti dokazane samo serološkom dijagnostikom. Kod ID-NAT testiranja okultne hepatitis B virusne infekcije mogu imati detektabilne i nedetektabilne faze. Jako je važno osobe koje su bile u kontaktu s HBV-om izdvojiti iz baze DDK-a jer se mogu nalaziti u nedetektabilnoj fazi OBI-e. Najvažnije su anti-HBc pozitivne

osobe sa ili bez anti-HBs protutijelima. Iz toga su razloga svi DDK koji su bili u kontaktu sa HBV-om trajno odgođeni za daljnja davanja krvi.

ID-NAT testiranje u našem Kliničkom zavodu započelo je 1. 5. 2013. godine. Naša tri razdoblja, odnosno 3 godine testiranja nakon uvođenja ID-NAT-a, možemo računati kao prve godine probira okultnih hepatitis B virusnih infekcija. Iz tog je razloga veći broj višestrukih DDK-a kod kojih je detektirana OBI (7) od broja DDK-a s OBI-om koji prvi puta daju krv (1). U tom se razdoblju dogodio značajan porast ukupnog broja DDK-a u našem Kliničkom zavodu zbog priključenja darivatelja krvi iz ostalih četiriju županija.

Tablica 5. pokazuje da je otkriven približan broj kroničnih hepatitisa (9), OBI-a (8) i kontakata s HBV-om (9), te je isto tako podjednak broj višestrukih (14) i novih DDK-a (12). Detekcija ovisi i o kontinuitetu darivanja krvi. Neki DDK krv daju redovno, svaka 3 mjeseca, dok pojedinci krv daju nakon više godina pa čak i desetaka godina. Treba naglasiti da je i u ovom slučaju važno povećanje velikog broja DDK-a iz ostalih četiriju županija.

Od ukupno 80 228 donacija, muškarci su darovali 68 110 donacija (84,90 %), a žene 12 118 (15,10 %). Mnogo je razloga zbog čega muškarci češće darivaju krv od žena. Između ostalog, više ih je zaposleno, u vojarnama čine većinu i krv mogu dati četiri puta godišnje za razliku od žena koje krv mogu dati tri puta godišnje. Na broj darivanja krvi žena utječu i menstrualni ciklus, trudnoća i dojenje. Kod DDK-a muškog spola podjednak je broj novih i višestrukih trajno odgođenih DDK-a. Na 80 228 donacija, od 26 trajno odgođena DDK-a, 25 je muškaraca (0,031 %) i 1 je žena (0,001 %). Očekivano, veći broj trajno odgođenih DDK-a je muškog spola zbog znatno većeg broja darivanih donacija od broja darivanih donacija žena (otprilike 5,5 puta više).

Stvarni broj HBsAg serološki reaktivnih rezultata nakon potvrdnog testiranja (njih 9) na ukupan broj donacija (80 228) u postotku iznosi 0,011 % što je manje od prevalencije HBsAg-a u Republici Hrvatskoj (više od 2 posto). Takav je rezultat očekivan s obzirom na to da DDK pripadaju tzv. „zdravoj populaciji“ građana. Republika Hrvatska spada u zemlje niske (u nekim navodima srednje) prevalencije hepatitisa B i C. U usporedbi s rezultatima serološkog testiranja u HZTM-u za 2013., 2014., i 2015. godinu postotak prevalencije je nešto višji (0,011 %) s obzirom na to da je postotak serološko potvrdno pozitivnih rezultata za te godine iznosio 0,008 %, 0,008 % i 0,006 %. To možemo objasniti također kontinuiranim povećanjem DDK-a iz ostalih četiriju županija. Naša zadaća nije samo prikupljanje, obrada, distribucija i primjena darivateljeve krvi, već i briga o darivatelju i njegovom zdravlju. Potvrdno nam testiranje služi

za potvrdu stvarno reaktivnih rezultata na temelju kojih se DDK-u šalje obavijest o trajnoj odgodi darivanja krvi i koje DDK-a upućuje na daljnje postupke za zaštitu svoga zdravlja.

Podjela trajno odgođenih DDK-a prema vrstama HBV infekcije opisana je na Tablici 5. Iz nje je vidljivo da je kronična HBV infekcija najčešće pronađena kod novih DDK-a. Razlog tome je i što višestruki DDK darujući krv redovito kontroliraju svoje zdravlje i testiraju se na prisutnost HBsAg-a. Višestruki DDK češće pripadaju skupini OBI-a i davnog kontakta s HBV-om iz razloga što je u tom razdoblju započelo ID-NAT testiranje.

Iz Tablice 7. vidljivo je da ukupan broj krvnih pripravaka proizveden iz prikupljenih 80 228 donacija krvi iznosi 233 014. U toj su tablici krvni pripravci podijeljeni prema vrsti. Vidljivo je da je u drugom i trećem razdoblju broj koncentrata eritrocita sa smanjenim brojem leukocita (KESBL) veći nego u prvom razdoblju. Ta činjenica govori u korist porasta kvalitete krvnog pripravka. Kod KESBL-a uklonjeni su leukociti koji kod pojedinaca mogu uzrokovati reakciju. U drugom i trećem razdoblju sve donacije koje su prikupljene bile su KESBL, a KE se nisu više proizvodili.

Trajno odgođenih DDK-a ukupno je 26. Iz njihovih donacija „pune krvi“ proizvedeno je 76 krvnih pripravaka što je 0,033 % od ukupnog broja proizvedenih krvnih pripravaka, što je prikazano u Tablici 8. Svi su ti pripravci izdvojeni iz banke krvnih pripravaka i propisno zbrinuti prema preporukama iz „Postupka evaluacije doza i darivatelja krvi prema rezultatima NAT-a i seroloških testova u transfuzijskoj djelatnosti RH“. Na taj je način direktno spriječena uporaba tih pripravaka i spriječen prijenos uzročnika krvlju prenosivih bolesti.

Trajno odgođeni DDK su evidentirani u transfuzijski program e-Delphyn koji se upotrebljava na području RH, tako da DDK koji su trajno odgođeni više ne mogu darovati krv na području RH. Veliki napredak u transfuzijskoj djelatnosti postignut je uporabom programa e-Delphyna. Cjeloviti transfuzijski program je na razini RH standardizirao postupke od uzimanja do primjene krvi i krvnih pripravaka. Dobivena je slijedivost svakog krvnog pripravka od uzimanja do primjene, a isto tako postoji i longitudinalno praćenje svakog DDK-a pojedinačno sa svim donacijama, njihovim pripravcima, vremenima uzimanja, obrade, proizvodnje i primjene. Na taj je način postignuta jednaka razina kvalitete i sigurnosti transfuzijskog liječenja na razini cijele RH.

## 6. ZAKLJUČCI

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

- Nakon testiranja potvrdnim serološkim testovima u HZTM-u, Petrova 3, Zagreb, od 98 suspektnih i reaktivnih donacija krvi broj stvarno reaktivnih rezultata na HBsAg iznosi 9 (0,011 %), kao i broj DDK-a koji su bili u kontaktu s HBV-om,
- Nakon individualnog testa amplifikacije nukleinskih kiselina (ID-NAT-a), kod 17 donacija dobiven je pozitivan rezultat. Kronični je hepatitis dokazan kod 9 donacija s visokom razinom HBV DNK što čini 0,011 % ukupnog broja testiranih donacija krvi. Okultna HBV infekcija je dokazana kod 8 donacija kod koje je razina HBV DNK niža od 200 IU/mL, što čini 0,010 % ukupnog broja testiranih donacija krvi,
- Usporedbom serološke i molekularne dijagnostike uočena je podudarnost seroloških probirnih i potvrdnih testova s ID-NAT-om u 9 slučajeva. Kod svih se DDK-a radilo o kroničnom hepatitisu B,
- Akutni hepatitis i infekcija tijekom dijagnostičkog prozora nisu uočeni,
- Isključivo potvrdnim serološkim testovima dokazan je kontakt s HBV-om u 9 slučajeva (pozitivni markeri HBV-a bez HBsAg-a) što čini 0,011 % od ukupnog broja testiranih donacija krvi,
- ID-NAT-om i dHBV-om u kombinaciji sa serološkim potvrdnim testiranjima dokazana je okultna hepatitis B virusna infekcija u 8 slučajeva (0,010 % od ukupnog broja testiranih donacija krvi),
- Na temelju rezultata seroloških probirnih i potvrdnih testova te molekularnog ID-NAT-a te dHBV testa trajno je odgođeno 26 DDK-a,
- Od 26 trajno odgođenih DDK-a, 12 DDK-a pripada skupini „novih“ DDK-a, odnosno DDK koji prvi puta daju krv, a 14 DDK-a pripadaju skupini višestrukih DDK-a, 25 je muškaraca i jedna žena,
- Od prikupljenih 80 228 donacija „pune krvi“, proizvedeno je 233 014 krvnih pripravaka,
- 76 pripravaka krvi proizvedenih iz 26 donacija trajno odgođenih DDK-a, odnosno 0,033 % od ukupnog broja donacija, izdvojena su i propisno uništena. Radi se o 11 koncentrata eritrocita, 14 koncentrata eritrocita sa smanjenim brojem leukocita, 22 svježe smrznute plazme, 3 plazme za frakcije, 25 „buffy coata“ te jedna doza „pune krvi“ koja je neprerađena zbog nedovoljno volumena,
- 76 krvnih pripravaka od 26 DDK-a nije proslijeđeno primateljima. Na taj je način direktno onemogućena uporaba reaktivnih donacija na HBsAg. Štoviše, u budućnosti je

onemogućeno darivanje krvi osobama trajno odgođenim na temelju pozitivnih rezultata na HBV.

## 7. SAŽETAK

### **Serološka i molekularna dijagnostika hepatitis B virusne infekcije u dobrovoljnih davatelja krvi u KBC Osijek**

**UVOD:** Hepatitis B virusna infekcija u različitim oblicima predstavlja veliki javnozdravstveni problem. U svrhu smanjenja prijenosa hepatitis B virusa putem transfuzije krvi uz serološko uvedeno je i molekularno ID-NAT testiranje koje smanjuje dijagnostički prozor i direktno dokazuje HBV DNK.

**CILJEVI RADA:** Utvrditi broj stvarno pozitivnih uzoraka donacija nakon potvrđne serološke i molekularne dijagnostike na HBV, usporedbom rezultata utvrditi podudarnost serološke i molekularne dijagnostike, utvrditi kategoriju HBV infekcije pozitivnih uzoraka donacija, utvrditi broj trajno odgođenih DDK-i te utvrditi smanjenje mogućeg prijenosa HBV-a transfuzijom krvi.

**MATERIJALI I METODE:** U istraživanju su korišteni rezultati obveznog probirnog serološkog testiranja krvi davatelja na HBV provedenog u KZTM KBC Osijek, te rezultati potvrđnih testiranja i rezultati molekularnog testiranja dobiveni u HZTM, Petrova 3, Zagreb.

**REZULTATI:** Nakon istraživanja u populaciji DDK-a uočene su: kronična i okultna HBV infekcija te davni kontakti s HBV-om. Akutna HBV infekcija i infekcija tijekom dijagnostičkog prozora nisu uočene. Podudarnost serološke i molekularne dijagnostike dokazana je kod slučajeva kronične HBV infekcije. Trajno je odgođeno 26 DDK-a, 25 muškaraca i jedna žena. 76 krvnih pripravaka iz donacija 26 trajno odgođenih DDK-a je uništeno.

**ZAKLJUČAK:** Stvarni broj HBsAg reaktivnih rezultata u postotku iznosi 0,011 % što je manje od prevalencije HBsAg-a u RH koja iznosi više od 2 %. U usporedbi s rezultatima u HZTM-u za 2013., 2014., i 2015. godinu postotak prevalencije je nešto višji ( 0,011 % ).

**KLJUČNE RIJEČI:** dobrovoljni davatelji krvi, hepatitis B virusna infekcija, ID-NAT test, krvni pripravci, serološka dijagnostika, trajna odgoda



## 8. SUMMARY

### **Serological and molecular testing of hepatitis B viral infection for blood donors in the Clinical hospital Osijek.**

**INTRODUCTION:** Hepatitis B viral infection represents a major public health problem. In order to reduce the transmission of hepatitis B through blood transfusion and because of the inability to detect occult hepatitis B viral infection by serological methods, molecular ID-NAT testing was introduced. Furthermore, the HBV DNA is directly identified.

**OBJECTIVES:** The aim was to determine the number of positive donor samples after confirmatory serological and molecular diagnosis of HBV. By comparison of serological and molecular diagnostics category of HBV infections all of the positive donor patterns as well as the number of permanently suspended blood donors have been identified. Furthermore, by determining the number of permanently suspended donors the reduction of possible HBV through blood transfusion was calculated.

**MATERIALS AND METHODS:** The data comprised of the results of the compulsory serological screening of HBV blood donors at the Clinical Institute for Transfusion Medicine at Clinical Hospital Centre Osijek, the results of validated tests, and the results of molecular ID-NAT and discriminatory HBV (dHBV) tests obtained at the Croatian Institute for Transfusion Medicine, Zagreb.

**RESULTS:** After the analysis, various forms of HBV in blood donors were identified: chronic and occult hepatitis B virus infection and previous contact with HBV. Acute HBV infection as well as infection during the diagnostic window was not observed. The correlation between serological and molecular diagnosis has been demonstrated in cases of chronic HBV infections. There were 26 blood donors, 25 men and one woman permanently suspended from donating blood. 76 blood preparations produced from donations of 26 permanently delayed blood donors were destroyed and thus their use was directly prevented.

**CONCLUSION:** The actual number of HBsAg serologically reactive results in percentage is 0.011% less than the prevalence of HBsAg in the Republic of Croatia, which is more than 2%. In comparison with serum test results at the Croatian Institute for Transfusion Medicine for 2013, 2014 and 2015, the prevalence rate is somewhat higher (0.011 %), since the percentage of serologically positive results for that year was 0.008 %, 0.008 % and 0.006.

**KEY WORDS:** blood donors, hepatitis B virus infection, ID-NAT test, blood preparations, serological diagnosis, permanent suspension

## 9. LITERATURA

1. Crveni križ Split. DDK - dobrovoljni davatelji krvi; dostupno na adresi: [www.crvenikriz-split.com/ddk/](http://www.crvenikriz-split.com/ddk/) . Datum pristupa: 17.11.2016.
2. Balen S. Osnove transfuzijske medicine. Osijek: Medicinski fakultet Osijek; 2010.
3. World health organization. What is hepatitis? Dostupno na adresi: [www.who.int/features/qa/76/en](http://www.who.int/features/qa/76/en) Datum pristupa: 17.11.2016.
4. Baruch S. Blumberg Institute. Hepatitis B Foundation. What is hepatitis? Dostupno na adresi: <http://www.hepb.org/what-is-hepatitis-b/what-is-hepb/>. Datum pristupa: 17.11.2016.
5. Včev A, Begić I. Infekcija hepatitis B virusom, 2008. Dostupno na adresi: <http://www.hcjz.hr/index.php/hcjz/article/view/978/936>. Datum pristupa: 17.11.2016.
6. Baruch S. Blumberg Institute. Hepatitis B Foundation. Acute vs. chronic infection. Dostupno na adresi: [www.hepb.org/what-is-hepatitis-b/what-is-hepb/acute-vs-chronic/](http://www.hepb.org/what-is-hepatitis-b/what-is-hepb/acute-vs-chronic/). Datum pristupa: 18.11.2016.
7. Burek V. laboratorijska dijagnostika virusnih hepatitisa B i C. Acta Med Croatica 2005; 59; 419-421.
8. Said ZNA. World J Gastroenterol. An overview of occult hepatitis B virus infection. Apr 21, 2011; 17(15): 1927-1938. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3082745/>. Datum pristupa: 18.11.2016.
9. Raimondo G, Allain JP, Brunetto Mr, Buenidia MA, Chen DS, Colombo M, Craxi A, Donato F, Ferrari C, Gaeta GB, et al. Statements from the Taomina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. J Hepatol. 2008;49:652-657
10. Centers for disease control & prevention. Interpretation of Hepatitis B serologic test results. Dostupno na adresi: <https://www.cdc.gov/hepatitis/hbv/pdfs/serologicchartv8.pdf>. Datum pristupa: 18.11.2016.
11. Slavulj M. Obvezna serološka testiranja u dobrovoljnih davatelja krvi. Osijek 2016.
12. 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.hztm.hr/dokumenti/postupak-za-evaluaciju-doza-krvi-i-davatelja-krvi-2016.pdf](http://www.hztm.hr/dokumenti/postupak-za-evaluaciju-doza-krvi-i-davatelja-krvi-2016.pdf). veljača 2015. Datum pristupa: 18.11.2016

13. Hrستیć I. Hepatitis B. Dostupno na adresi:

<http://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/11797/Hepatitis-B.html>. Datum pristupa 20.11.2016.

14. Lesnikar V. Epidemiologija hepatitisa B i C u Hrvatskoj. Acta Med Croatica 2005;59;383-8

15. Bradarić N, Vucelić B. Hepatitis B. Medicus 2006. Vol. 15. No 1. 121-130

16. Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu. Transfuziloški vjesnik. Dostupno na adresi:

<http://www.hztm.hr/glasilo/>. Datum pristupa: 20.11.2016

17. 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](http://www.diasorin.com/sites/default/files/allegati_prodotti/Murex%20HBsAG%20Version%203.pdf). Datum pristupa: 25.11.2016.

18. 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: 25.11.2016.

19. Bio-Rad. MonolisaHBsAg ULTRA Confirmatory. Dostupno na adresi: [http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/en/Literature/inserts/883588\\_GB.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/en/Literature/inserts/883588_GB.pdf). Datum pristupa

25.11.2016.

20. Balića M i sur. Pojmovnik transfuzijske medicine. Medicinska naklada Zagreb; 1995.

21. Hans R, Marwaha N. Nucleic acid testing – benefits and constraints. Dostupno na adresi:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3943139/>. Datum pristupa: 1.12.2016.

22. US food and drug administration. Procleix Ultrio Plus Assay. Dostupno na adresi:

<https://www.fda.gov/downloads/scienceresearch/fieldscience/ucm092120>. Datum pristupa: 1.12.2016.

## **10. ŽIVOTOPIS**

### **OSOBNI PODATCI**

Ime i prezime: Nikolina Lovrić

Datum i mjesto rođenja: 6. kolovoza 1990., Slavonski Brod

Adresa stanovanja: Slavonija 1 6/3, 35000 Slavonski brod

E-mail: nikolina.lovric90@gmail.com

### **OBRAZOVANJE**

1997. - 2005. - osnovno obrazovanje

2005. - 2009. - Srednja medicinska škola Slavonski Brod, smjer Medicinska sestra

2012. – 2016. - Medicinski fakultet Osijek, preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike