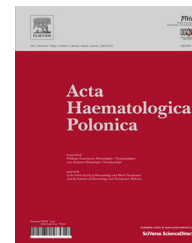


Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](#)

Acta Haematologica Polonica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/achaem

Praca poglądowa/Review

Bezpieczeństwo krwi w aspekcie badań wirusologicznych



Viral markers screening and transfusion safety

Piotr Grabarczyk*

Zakład Wirusologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Kierownik: prof. dr hab. n. med. Magdalena Łętowska, Warszawa, Polska

INFORMACJE O ARTYKULE

Historia artykułu:

Otrzymano: 31.05.2013

Zaakceptowano: 02.07.2013

Dostępne online: 19.07.2013

Słowa kluczowe:

- HCV
- HBV
- HIV
- okienko diagnostyczne
- zakaźność
- dawcy krwi
- bezpieczeństwo przetoczeń

Keywords:

- HCV
- HBV
- HIV
- Window period
- Infectivity
- Blood donors
- Transfusion safety

ABSTRACT

Current residual infection risk by transfusion for hepatitis B and C viruses (HBV, HCV) and for human immunodeficiency virus (HIV) is the lowest in the history. It has been achieved mainly by introduction of serological markers screening (HBsAg, anti-HCV and anti-HIV) and nucleic acid testing (NAT). These procedures allow identifying donors infected in chronic and very early stages of the infection.

The incidence and prevalence of HBV and HCV infection among blood donors in Poland remain stable, however in the case of HIV, in recent years, an increasing trend is seen.

The residual risk of infection is associated primarily with diagnostic window. For donations tested individually, this period is estimated to be 11.6, 1.5, 3.3 days for HBV, HCV and HIV, respectively. In the case of screening in plasma pools of eight donations it is calculated for 18.2, 2.7 and 5.5 days. Particularly for HIV, polymorphism at the genomic level is an additional risk factor.

Recent observations confirm that, infectivity during window period is very high – even single virions could transmit infection. At the final stage of chronic HBV infection (OBI) infectivity is still significant but much lower (about 1,000 copies).

In recent years it has been demonstrated that increased analytical sensitivity translates into a significant improvement of the clinical sensitivity. Further reduction of the diagnostic window for individual donations testing is possible by increasing the efficiency of the extraction and amplification (e.g. HBV in Ultrio Plus and Ultrio Elite) or by increasing the volume of the test sample (e.g., HCV and HIV in tests based on TMA or PCR). It was demonstrated that the amplification of more than one region of the HIV genome contribute to the recovery/improvement of clinical sensitivity lost in the case of blood donations infected with escape mutants.

One way to reduce the number of infected donors is to improve selection process involving questionnaire and interview before every donation. The process should be updated based on the analysis of current sources of infection.

© 2013 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o. All rights reserved.

* Adres do korespondencji: Zakład Wirusologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. I Gandhi 12, 02-972 Warszawa, Polska. Tel.: +48 22 349 66 00 wewn. 135; fax: +48 22 349 66 14.

Adres email: pgrabarczyk@ihit.waw.pl.

Wprowadzenie

Wiele wirusów zakażających ludzi w swoim cyklu życiowym pojawia się we krwi i może stanowić potencjalne źródło zakażenia biorcy krwi i jej składników [1]. W niniejszym opracowaniu, na podstawie aktualnego piśmiennictwa, dokonano oceny ryzyka zakażenia przez transfuzję wirusami, które są badane rutynowo u dawców krwi – wirusem zapalenia wątroby typu B (HBV), typu C (HCV) i ludzkim wirusem niedoboru odporności (HIV). Ryzyko zakażenia HCV, HBV i HIV jest wypadkową wielu czynników. W pracy przeanalizowano aktualną sytuację epidemiologiczną, wpływ czułości analitycznej i klinicznej obecnie stosowanych testów przeglądowych na ryzyko zakażenia przez krew. Przedstawiono najnowsze dane dotyczące zakaźności przez transfuzję. Omówiono także obecną rolę badania DNA parwowirusa B19 (B19V) i jego perspektywy w zapewnieniu bezpieczeństwa przetoczeń krwi.

Wysokie bezpieczeństwo przetoczeń krwi i jej składników zostało osiągnięte m.in. przez wprowadzenie badań markerów zakażeń wirusowych przed każdą donacją. Tego typu działania w Polsce rozpoczęto na początku lat siedemdziesiątych wraz z sukcesywnym wprowadzaniem badań antygeny HBs u dawców krwi [2]. Od 1987 roku wszyscy dawcy badani są na obecność przeciwciał anti-HIV [3], a od 1994 anti-HCV [4]. Przełom minionego i początek obecnego stulecia stał pod znakiem wprowadzania badań przeglądowych metodami biologii molekularnej. W 1999 rozpoczęto badania RNA HCV u dawców osocza przeznaczonego do frakcjonowania, a od 2002 objęto nimi wszystkich dawców. W 2005 roku wprowadzono obowiązkowe badania RNA HIV i DNA HBV u wszystkich dawców [5].

Przez okres ponad 30 lat doskonalono metodykę badań przeglądowych. Metody serologiczne i molekularne charakteryzowały się coraz większą czułością analityczną, a także kliniczną, ponieważ identyfikują m.in. zakażenia formami polimorficznymi dotychczas niewykrywalnymi (np. mutantami ucieczki HBV). Znaczenie i efektywność tych działań dla bezpieczeństwa biorców pokazuje porównanie częstości zakażeń wśród osób leczonych krwią lub/i jej składnikami przed i po wprowadzeniu badań przeglądowych [6].

Czynniki wpływające na aktualne ryzyko zakażenia HCV, HBV i HIV przez transfuzję w Polsce

Pozostałe ryzyko zakażenia wirusami HCV, HBV i HIV przez transfuzję związane jest przede wszystkim z tzw. okienkiem diagnostycznym. „Okienko diagnostyczne” to okres od momentu zakażenia do pojawienia się wykrywalnego w badaniach przeglądowych markera zakażenia. W przypadku każdego z rozpatrywanych wirusów, w początkowym okresie, kiedy zakażony organizm nie wytwarza jeszcze przeciwciał, krew charakteryzuje się największą zakaźnością.

Okienko diagnostyczne dla HCV i HIV jest szacowane odpowiednio na nie więcej niż 3 i 6 dni, a dla HBV na 17 dni. Długość tego okresu z jednej strony zależy od czułości metody stosowanej do prowadzenia badań przeglądowych,

z drugiej strony od tempa replikacji poszczególnych wirusów. Dynamika namnażania się wirusa determinuje czas, jaki musi minąć, aby stężenie wirionów we krwi osiągnęło poziom wykrywalny w badaniu przeglądowym. Dla wirusa HCV, który podwaja swoją ilość bardzo szybko, wciągu 8–10 godzin, okienko diagnostyczne przy prowadzeniu badań metodami NAT (*nucleic acid testing*) o najwyższej czułości analitycznej w indywidualnych donacjach (IDT; *individual donation testing*) szacowane jest na nie więcej niż 3 dni. Potencjał replikacyjny HIV jest nieznacznie mniejszy (podwojenie liczby wirionów trwa ok. 14 h). W przypadku tego wirusa okres, kiedy jego stężenie jest poniżej poziomu detekcji testów przeglądowych, nie przekracza 6 dni. Najdłuższe trwające okienko diagnostyczne ma miejsce w przypadku HBV. Stężenie DNA HBV ulega podwojeniu po 2,8 dnia i dlatego wykrycie właśnie tego markera w pojedynczej donacji jest możliwe dopiero po około 17 dniach od momentu zakażenia.

Krew w okresie okienka serologicznego (od momentu zakażenia do pojawienia się markerów serologicznych) jest wysoce zakaźna i nawet pojedyncze wiriony są wystarczające do przeniesienia zakażenia. Pojawienie się przeciwciał, które towarzyszą przewlekłemu zakażeniu, powoduje zmniejszenie zakaźności krwi 100–1000 razy (dane podsumowane w [7]). Nadal bardzo mało wiadomo na temat infekcyjności krwi osób znajdujących się w końcowej fazie przewlekłego zakażenia HBV, które określane jest mianem zakażenia ukrytego (*occult hepatitis B infection*, OBI). Na tym etapie antygen HBs nie jest wykrywalny, natomiast obecnemu w organizmie, zazwyczaj wykrywalnemu w osoczu, DNA HBV w większości przypadków towarzyszą przeciwciała do antygeny rdzeniowego (anty-HBc) [8].

HBV

Na początku lat osiemdziesiątych zapadalność na zakażenie HBV w Polsce była najwyższa w Europie (45 przypadków na 100 000 mieszkańców na rok) [9]. Wykrywalność antygeny HBs (HBsAg) u pierwszorazowych dawców krwi w latach 1995–2004 wynosiła około 0,8%. W analizowanym okresie obserwowano spadek częstości tego markera wśród dawców, zarówno pierwszorazowych, jak i wielokrotnych. W drugiej grupie tendencja malejąca była istotnie silniej zaznaczona i wynosiła 20,7% na rok, (spadek z 0,088% w roku 1995 do 0,017% w 2004 roku) wobec 5,4% na rok u dawców pierwszorazowych (spadek z 0,79% do 0,67% w tym samym czasie) [10]. W kolejnych latach częstość wykrywania HBsAg w populacji dawców ustabilizowała się – od 2007 roku utrzymuje się na poziomie 0,5%. Wśród dawców wielokrotnych HBsAg identyfikowany jest sporadycznie (0,001–0,0004%) (dr M. Mikulska – dane w trakcie opracowania). W badaniach przeprowadzonych u siedmiu tysięcy losowo wybranych dawców RCKiK Kraków, stwierdzono, że aż 8% z nich jest nosicielami przeciwciał skierowanych do antygeny rdzeniowego HBV (anty-HBc), świadczących o przebytych zakażeniu lub ekspozycji [11].

Obecne ryzyko zakażenia HBV przez przetoczenia krwi i jej składników związane jest przede wszystkim z okienkiem diagnostycznym. Od momentu wprowadzenia obowiązku badania DNA HBV w Polsce, metodyka badań technikami

biologii molekularnej była udoskonalana. Początkowo badania były prowadzone w pojedynczych donacjach lub pulach utworzonych przez zlanie osocza z 24 donacji. Od stycznia 2007 roku ze względu na wysoką zakaźność HBV w okienku serologicznym oraz częste występowanie OBI u dawców krwi w Polsce [8, 12] wprowadzono limit czułości analitycznej badań przeglądowych na poziomie 24 IU/ml (próg wykrywalności 95% – LOD; *limit of detection*). Aby wypełnić to zalecenie, w Centrach Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (CKiK), które prowadziły badania w pulach, zmniejszono liczbę donacji w puli do 6. Dodatkowo, w tym czasie wprowadzono czulsze testy oparte na metodzie *real-time* PCR. W konsekwencji tych zmian nastąpiło pięciokrotne zwiększenie czułości analitycznej, z 120 IU/ml do 24 IU/ml (95% LOD), a w okresie późniejszym obserwowano blisko 13-krotne zwiększenie częstości identyfikacji zakażeń w okienku serologicznym oraz prawie 7-krotny wzrost częstości wykrywania OBI [13].

W 2010 roku CKiK, stosując technologię amplifikacji przez transkrypcję (TMA; *transcription mediated amplification*) zastąpiły test Procleix Ultrio testem nowej generacji – Procleix Ultrio Plus. Podstawowa różnica między testami dotyczyła zastosowania w teście nowszej generacji na etapie izolacji stężonego wodorotlenku litu, który zwiększa efektywność rozbijania wirionów HBV i uwalniania ssDNA wirusa do dalszej amplifikacji. Badania przeprowadzone w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii (IHIT) wykazały, że konsekwencją tej modyfikacji jest zwiększenie średnio 2,4 raza (95% CI; przedział ufności: 1,4–4,8) czułości analitycznej wykrywania DNA HBV wyrażonej w 95% LOD do poziomu 4,6 IU/ml (95% CI: 3,2–7,2). Analiza wyników badania paneli rozcieńczeń osocza zakażonego poszczególnymi genotypami HBV (A-G) pozwoliła stwierdzić zwiększenie czułości z 1,3 do 7,3 raza w Ultrio Plus w porównaniu z testem Ultrio. Stosując analizy matematyczne, na podstawie wyników badania rozcieńczeń standardu WHO, oszacowano, że po zastąpieniu Ultrio testem Ultrio Plus należy się spodziewać ograniczenia długości trwania okienka diagnostycznego HBV o średnio 3,3 dnia (95% CI: 0,9–5,7) [14]. Przy założeniu, że stosowany jest algorytm postępowania aktualnie obowiązujący w Polsce [15], ryzyko wyrażone w liczbie dni okienka diagnostycznego dla Ultrio Plus jest szacowane na 11,6 dnia, gdy badania przeglądowe są prowadzone w pojedynczych donacjach, oraz 17,7 dnia, gdy badaniu poddawane jest osocze zlewane w pulę z 8 donacji [16].

2,4-krotne podniesienie czułości analitycznej wykrywania DNA HBV przekłada się na wzrost czułości klinicznej testu Ultrio Plus w porównaniu z testem Ultrio. Zwiększenie efektywności testu nowej generacji zostało udokumentowane w trakcie badań przeprowadzonych w Regionalnych Centrach Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (RCKiK) w Łodzi, Warszawie i Krakowie oraz w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii (IHIT). Badania przeglądowe blisko 10 tysięcy donacji prowadzono równoległe testami Ultrio i Ultrio Plus. W trakcie ich trwania zidentyfikowano dawcę z OBI, w osoczu którego DNA HBV zostało wykryte wyłącznie testem nowej generacji. Dodatkowo testem Ultrio Plus wykryto DNA HBV u dawcy, u którego powtarzalnie reaktywny wynik badania HBsAg został potwierdzony w teście neutralizacji, jednak wynik badania testem Ultrio pozostawał ujemny [14]. Zidentyfikowano jeszcze jednego dawcę z HBsAg potwierdzonym

w teście neutralizacji, u którego DNA HBV nie zostało wykryte w badaniu przeglądowym w prowadzonym w pojedynczej donacji. W retrospektywnie wykonanych 24 powtórzeniach badania odpowiednio żadne i 4 oznaczenia były reaktywne w teście Ultrio i Ultrio Plus. Uzyskane wyniki pokazują, że obecnie nie jest możliwe zastąpienie oznaczania HBsAg testami wykrywającymi DNA wirusa.

Dostępne panele rozcieńczeń różnych form polimorficznych pozwalają na określenie czułości wykrywania różnych genotypów. Obserwowane jest zróżnicowanie czułości wykrywania genotypów zakażających polską populację. Przykładowo, w badaniach przeprowadzonych w IHIT 95% LOD (CI) testu Ultrio Plus wahało się od 24,3 (17,1–38) kopii/ml do 46,1 (27,5–91) dla różnych materiałów referencyjnych genotypu A. W przypadku drugiego najczęściej zakażającego Polaków genotypu D różnice były jeszcze większe – od 12,7 (8,1–23) do 48,1 (21,4–194) kopii/ml. Otrzymane wyniki prowadzą do wniosku, że okienko diagnostyczne jest najprawdopodobniej skracane w różnym stopniu nie tylko w przypadku różnych genotypów, ale nawet różnych form polimorficznych w ramach tego samego genotypu [14].

Obserwacje Vermeulen i wsp. wskazują, że badania w pojedynczej donacji, choć najbardziej skracają okienko diagnostyczne, nie ograniczają całkowicie ryzyka przeniesienia HBV w przypadku zakażenia dawcy na wczesnym etapie. Badacze z RPA opisali przypadek przeniesienia HBV zidentyfikowany w trakcie procedury *trace back* u 28-letniego mężczyzny. Po 84 dniach od przetoczenia koncentratu krwinek czerwonych (KCCz), w związku z operacją po wypadku motocyklowym, stwierdzono u niego objawy zapalenia wątroby typu B. Badania molekularne obejmujące analizę DNA HBV wykazały, że źródłem wirusa był dawca zakażony na etapie okienka diagnostycznego, jeszcze przed wytworzeniem przeciwciał anty-HBc i pojawieniem się wykrywalnego antygeny HBs. W badaniu przeglądowym w pojedynczej donacji wykonanym metodą Ultrio Plus (95% LOD 2,1 IU/ml) nie wykryto genomu wirusa. Retrospektywnie badanie wykonano w 30 powtórzeniach i uzyskano wynik reaktywny 24 razy, co pozwoliło oszacować liczbę wirionów w przetoczonym KCCz na 32 (95% CI: 22–43) [17]. Przedstawiona obserwacja potwierdza wcześniejsze szacunki wskazujące na niezwykle wysoką zakaźność HBV w okienku serologicznym.

Badanie DNA HBV pozwala dodatkowo wykrywać 1) tzw. mutanty ucieczki – szczepy, w których zmiany nukleotydowe powodują substytucje aminokwasowe sprawiające, że zakażenie nie jest rozpoznawane w trakcie badania przeglądowego HBsAg oraz 2) zakażenie na końcowym etapie przewlekłego zakażenia HBV, tzw. OBI, charakteryzujące się bardzo niskim poziomem DNA HBV (<100 IU/ml). Niewiele wiadomo na temat zakaźności donacji od dawców z OBI. Badania Japońskiego Czerwonego Krzyża oparte na analizie wyników procedury *look back*, wszczynanej w wyniku badań przeglądowych HBV NAT, w pulach osocza z 50 donacji oraz anty-HBc wykazały nieznaczną zakaźność OBI przez transfuzję (3%) [18]. Uważa się, że zakaźność donacji od dawców z OBI ma miejsce przede wszystkim, gdy wykrywane są jedynie przeciwciała anty-HBc, choć opisano jeden przypadek przeniesienia od dawcy z anty-HBs [19]. Niedawno opublikowana praca opisująca analizę wyników procedur

look back i trace back prowadzonych w pięciu Europejskich ośrodkach, w tym w Polsce, wskazuje na znacznie wyższą zakaźność OBI. W pracy podjęto próbę oceny zakaźności przede wszystkim na podstawie analizy wykrywalności anty-HBc, jako markera przebytego zakażenia HBV. U 45 spośród 105 par dawca-biorca (42,9%) stwierdzono przeciwciała o tej właśnie swoistości. Po uwzględnieniu średniej częstości anty-HBc w populacji współczynnik przeniesienia/transmisji został skorygowany do 28%. Częstość anty-HBc wynosiła aż 63,6% (28/44) u nieszczepionych biorców, którzy otrzymali transfuzje od anty-HBs ujemnych dawców z OBI. Zaledwie 15,4% z grupy analizowanych biorców było dodatnich zarówno w anty-HBc jak i anty-HBs, co potwierdza, że obecność anty-HBs istotnie obniża zakaźność OBI. Otrzymane wyniki wskazują, że zakaźność donacji anty-HBs-ujemnych zależy od objętości przetoczonego osocza i wynosi 85–100% dla osocza świeżomrożonego – FFP (zawierającego około 200 ml osocza), 51% dla koncentratu płytkowego – KKP (50 ml osocza) i 24% dla koncentratu krwinek czerwonych – KKCZ (20 ml osocza). 50% minimalnej dawki zakaźnej (ID_{50}) oszacowano na 1049 (95% CI: 117–3441) kopii [20].

HCV

Zaraz po rozpoczęciu badania markerów serologicznych zakażenia HCV u dawców częstość wykrywania anty-HCV wynosiła 1,4%. Wśród dawców pierwszorazowych w latach 1996–2003 obserwowano spadek częstości wykrywania przeciwciał anty-HCV o 4% rocznie (95% CI: 2–6%). W tym samym okresie wśród dawców wielokrotnych spadek wykrywalności był wyraźniejszy i wynosił rocznie aż 21% (95% CI: 17–24%). Wśród dawców pierwszorazowych najwyższe rozpowszechnienie obserwowano w województwach: śląskim (1,0%), małopolskim (1,0%), świętokrzyskim (1,0%), łódzkim (1,0%), lubelskim (1,0%) i kujawsko-pomorskim (1,0%). Wśród dawców wielokrotnych, w łódzkim (0,4%) oraz podlaskim (0,3%) i dolnośląskim (0,3%) [21]. Ostatnio przeprowadzona analiza danych z lat 2004–2012 wykazała, że mimo łącznie mniejszej częstości u dawców pierwszorazowych (0,8%) częstość wyników powtarzalnie reaktywnych w skali całego kraju wzrosła z 0,72% do 0,87%. Nieznaczny trend wzrostowy obserwowano także u dawców wielokrotnych (średnio 0,19%, wzrost z 0,11% w 2004 do 0,23% w 2011). Należy jednak podkreślić, że procent zakażeń potwierdzonych utrzymuje się na stałym poziomie (u dawców pierwszorazowych 0,36% w 2008 i 0,31% w 2011 oraz odpowiednio 0,01–0,02% u wielokrotnych).

Po przebadaniu blisko 12 milionów donacji zakażenie HCV na wczesnym etapie, w tzw. okienku serologicznym (WP) zidentyfikowano u 120 dawców. Zarówno liczba, jak i częstość tego typu zakażeń w porównaniu z innymi krajami prowadzącymi badania RNA HCV jest bardzo duża [22]. Ponieważ zakaźność krwi przed wytworzeniem przeciwciał jest bardzo wysoka, należy przypuszczać, że wprowadzenie badań przeglądowych RNA HCV w naszym kraju mogło zapobiec nawet 360 nowym przypadkom zakażeń (przy założeniu, że z jednej donacji przygotowywane są trzy składniki krwi). Rocznie identyfikuje się od jednej do 20 osób

z HCV WP. Obserwowana jest tendencja malejąca częstości tego typu zakażeń.

Dotychczas, w procedurze trace back, zidentyfikowano jeden przypadek przeniesienia zakażenia HCV przez koncentrat krwinek czerwonych (KKCz) mimo badania RNA HCV w puli osocza z 24 donacji. Jest to jedyny udokumentowany przypadek przeniesienia zakażenia HCV przez transfuzje w Polsce (częstość około 1:12 mln donacji) od wprowadzenia obowiązkowych badań NAT [23].

Wspomniane wcześniej polskie badania porównujące testy przeglądowe kolejnej generacji wykorzystujące technologię TMA wykazały, że czułość Ultrio i Ultrio Plus jest na porównywalnym poziomie (95% LOD [CI] odpowiednio 9,0 [5,5–17,3] oraz 9,3 [5,81–17,3]). Zatem długość trwania okienka diagnostycznego przy zastosowaniu tych testów jest taka sama i została oszacowana na 1,41 dnia, gdy badania przeglądowe prowadzone są w pojedynczych donacjach, i 2,62 dnia, gdy donacje badane są w minipulach utworzonych z 8 donacji (MP8) [16].

Wobec wciąż wysokiej częstości nowych zakażeń HCV, widocznej zwłaszcza wśród dawców wielokrotnych i objawiającej się utrzymywaniem się znaczącej liczby zakażeń seroujemnych (w tzw. okienku serologicznym) ważne jest doskonalenie procesu kwalifikacji dawców. Przeprowadzono analizę ankiet epidemiologicznych, które są wypełniane przez dawców zakażonych HCV w ostatnim czasie w celu oceny czynników ryzyka. Ankieta zawierała pytania dotyczące charakterystyki dawców, ich zachowań oraz ostatnio odbytych podróży. Odpowiedzi udzielone przez dawców zakażonych HCV (grupa I) porównano z informacjami uzyskanymi od dawców niezakażonych dopasowanych pod względem płci i wieku (kontrola ujemna – grupa II). W okresie 2000–2011 zgromadzono ankiety od 42 wielokrotnych dawców krwi zakażonych HCV, dawców zakażonych HCV w okienku oraz 126 dawców grupy kontrolnej. Zidentyfikowano następujące prawdopodobne czynniki związane z zakażeniem HCV ($p < 0,05$) (OR, 95% CI): ekspozycja na cudzą krew (głównie w trakcie bójek i wypadków; 25,3; 5,57–115,23), tatuaż (19,55; 2,30–166,45), przyjmowanie narkotyków (9,76; 3,19–29,89), dwóch i więcej partnerów seksualnych w ciągu 6 miesięcy przed donacją (11,72; 2,51–54,70) i wspólne korzystanie z golarek/szczoteczki do zębów (6,42; 1,67–24,64). Wyniki tego typu analiz mogą być wykorzystywane do modyfikowania kwestionariusza stosowanego do odraczania dawców należących do grup ryzyka zakażenia HCV i aktualizacji materiałów informacyjnych dla dawców i tym samym mogą wpływać na podniesienie bezpieczeństwa transfuzji krwi [24].

HIV

Częstość potwierdzonych zakażeń seropozytywnych wirusem HIV wśród dawców krwi w Polsce w ostatnich latach rośnie. Zjawisko to jest związane przede wszystkim ze zwiększoną liczbą zakażonych dawców wielokrotnych. W latach 2005–2007 częstość zakażeń wirusem wynosiła 0,98:100 000 donacji, podczas gdy w okresie kolejnych trzech lat wzrosła do 2,04:100 000. Badanie RNA HIV było wprowadzane sukcesywnie od 2003 w tych CKiK, które zdecydowały

się rozpocząć badania RNA HCV metodą TMA. Oprócz tego markera testy te wykrywały kwasy nukleinowe HIV. W 2005 badaniami RNA HIV objęto obowiązkowo wszystkich dawców krwi w Polsce. Zakażenie HIV w okienku serologicznym do końca roku 2012 zidentyfikowano u 12 dawców (częstość ok. 1:600 000 donacji) ([25, 26] oraz dr M. Mikulska – informacja ustna).

Ryzyko przeniesienia HIV przez transfuzje związane z okienkiem diagnostycznym wydaje się być obecnie niewielkie. Wyrażone w liczbie dni okienko diagnostyczne dla Ultrio Plus wynosi 3,09, gdy badania przeglądowe są prowadzone w pojedynczych donacjach, oraz 5,43, gdy badaniu poddawane jest osocze zlewane w pule z 8 donacji [16].

Przeprowadzono kalkulację ryzyka zakażenia HIV, wykorzystując dane epidemiologiczne z różnych części świata. W analizie dla Europy Centralnej uwzględniono dane epidemiologiczne pochodzące m.in. z RCKiK w Warszawie. Przy prowadzeniu badań anty-HIV oraz RNA HIV w pojedynczej donacji ryzyko przeniesienia infekcji przez transfuzję szacowane jest średnio na 0,15:1 000 000 donacji (przy założeniu, że 50% minimalnej dawki zakaźnej [ID₅₀] w trakcie okienka serologicznego wynosi 3,16 wirionów dla KKCz). Wynik szacunkowych wyliczeń oznacza, że należy się spodziewać nie więcej niż jednego przypadku przeniesienia HIV przez transfuzję na blisko 7 lat, przy założeniu, że co roku pobierany jest ok. 1 milion donacji. W przypadku gdyby badania prowadzono w puli po 8 donacji, wskaźnik ten rośnie do poziomu 0,28 (jeden przypadek zakażenia przez transfuzję na 3,5 roku) [27].

Innym istotnym źródłem ryzyka zakażenia wirusem HIV jest jego polimorfizm. Nie jest znana dokładnie skala występowania mutantów, w trakcie badania których uzyskiwane są wyniki fałszywie ujemne. W Niemczech opisano przypadki zakażenia mutantami HIV, które nie zostały wykryte w badaniu przeglądowym NAT [28–30]. O ile u zachodnich sąsiadów Polski mutanty ucieczki dotyczyły najpowszechniejszego obecnie na świecie podtypu B, to donacje fałszywie negatywne w badaniu metodami biologii molekularnej opisane we Włoszech dotyczyły form zrekombinowanych [31]. Wszystkie te obserwacje są istotnym argumentem przeciw rezygnacji z badań serologicznych w krajach, gdzie prowadzi się badania przeglądowe kwasów nukleinowych HIV. Wykazano, że skuteczną metodą ograniczenia ryzyka wyników fałszywie ujemnych w NAT jest stosowanie testów amplifikujących jednocześnie przynajmniej dwa regiony genomu HIV [29–32].

Inną grupą osób zakażonych, u których mogą wystąpić trudności diagnostyczne w trakcie badań przeglądowych, są tzw. *elite controllers*. W krajach z wysoką częstością zakażeń HIV stanowią oni ok. 2–4% zakażonych dawców. Należą do nich osoby, u których RNA HIV nie jest wykrywalne w osoczu metodami o czułości 50–70 kopii RNA/ml, mimo że przez przynajmniej dwa lata byli powtarzalnie reaktywni w badaniu anty-HIV, a wyniki przeglądowych badań serologicznych potwierdzano w teście *Western blot*. Wiadomo o nich, że nigdy nie podawano im leków antyretrowirusowych. W większości tych przypadków RNA wirusa wykrywalne jest w komórkach krwi, podobnie jak prowirusowe DNA. W przypadku takiego przebiegu zakażenia cząsteczki wirusowe są zdolne do replikacji, ale zakaźność krwi i jej

składników nie jest znana [7, 27]. Dotychczas nie zidentyfikowano ani jednego takiego przypadku wśród zakażonych dawców krwi w Polsce [33]. Istnienie takiego przebiegu zakażenia nadal jest dodatkowym argumentem przemawiającym za utrzymaniem badań przeglądowych metodami serologicznymi w krajach, gdzie badane jest RNA HIV.

Parwovirus B19 (B19V)

Obecnie badanie B19V u dawców jest ograniczone do oznaczania DNA B19V metodami ilościowymi u osób, których osocze jest przeznaczone do produkcji immunoglobuliny anty-D i anty-HBs, oraz dawców krwinek wykorzystywanych do immunizacji. W wyniku badań przeglądowych czasowo odsuwani są dawcy, u których stężenie wirusa może spowodować przekroczenie poziomu 10⁴ IU/ml w puli produkcyjnej, zazwyczaj tworzonej przez zlanie osocza pochodzącego z ponad 100 donacji. Istotną trudnością, którą można napotkać w trakcie badań B19V, jest występowanie wyników fałszywie ujemnych lub zaniżonych w przypadku zakażenia niektórymi formami polimorficznymi (genotyp 2 i 3). Jest to konsekwencja uwzględniania, jeszcze do niedawna, w trakcie projektowania testów jedynie sekwencji genomu najpowszechniejszego genotypu 1 [34, 35].

Wiadomo także, że B19V osiąga wyjątkowo wysoką wiramię, zwłaszcza we wczesnej fazie zakażenia, jeszcze przed pojawieniem się swoistych przeciwciał. Taka wysoka wiramię, przekraczająca górny zakres liniowości testu przeglądowego może być przyczyną wyników fałszywie ujemnych [36, 37]. Obecnie w Polsce, do badań dawców dopuszczane są wyłącznie testy, które nie zaniżają ilości DNA B19V wszystkich obecnie znanych genotypów oraz prawidłowo określają wiramię przekraczające górny zakres liniowości [38].

Perspektywy dalszego ograniczenia ryzyka zakażenia przez krew

Obecnie stosowane metody detekcji wirusów przyczyniły się do uzyskania najwyższego w historii bezpieczeństwa transfuzji. Dalsze zmniejszenie ryzyka może zostać osiągnięte m. in. przez zwiększenie czułości testów. Tylko w niektórych testach możliwa jest poprawa czułości przez zwiększenie efektywności amplifikacji/ekstrakcji kwasów nukleinowych (np. HBV w teście TMA). Jednak w przypadku pozostałych markerów możliwa jest poprawa czułości wyłącznie przez dalsze zwiększanie objętości badanej próbki.

Ważnym problemem jest wykrywanie wszystkich znanych form polimorficznych. Dlatego podstawowym narzędziem do oceny czułości analitycznej powinny być już nie tylko pojedyncze próbki zakażone jedną formą polimorficzną, jak jest w przypadku większości dotychczas dostępnych standardów międzynarodowych WHO, ale stosowanie materiału referencyjnego na bazie jak najszerzego panelu genotypów [39–41].

Poprawa czułości klinicznej testów NAT może być osiągnięta przez poprawę wykrywalności form polimorficznych,

m.in. przez zastosowanie amplifikacji więcej niż jednego regionu genomu wirusa.

Istotnym zagadnieniem jest ustalenie zakaźności B19V przez pojedyncze donacje. Obserwacje Satake i wsp. pokazują, że krew od dawcy zakażonego B19V zawierająca nawet 10^3 IU/ml i swoiste przeciwciała może przenieść zakażenie na chorego z osłabioną odpornością [42]. Znajomość konkretnej wartości ID_{50} , umożliwiłaby ustalenie ryzyka zakażenia u osób z obniżoną odpornością i chorych immunokompetentnych, w zależności od stosowanych składników krwi. Wiadomości te są szczególnie istotne dla podjęcia racjonalnej decyzji o przetaczaniu chorym z grup wysokiego ryzyka powikłań zakażeń B19V, składników krwi badanych metodą ilościową w kierunku DNA B19V. Problem ten dotyczy w szczególności chorych po przeszczepach i zakażonych wirusem HIV. Coraz częściej zasadność używania składników krwi badanych w kierunku B19V jest podnoszona w odniesieniu do transfuzji dopłodowych [43].

Analizy matematyczne pozwalają ocenić ryzyko zakażeń dla badań przesiewowych charakteryzujących się różną czułością. Wyniki tego typu obliczeń wskazują, że prowadzenie badań populacji o większej częstości zakażeń uzasadnia zastosowanie podwyższonej czułości testów (np. przez badanie w pojedynczych donacjach). Ten sam poziom ryzyka może występować w przypadku badania o mniejszej czułości (np. badanie w pulach) na terenie z lepszą sytuacją epidemiologiczną (zwłaszcza tam, gdzie rzadziej występują przypadki zakażeń u dawców wielokrotnych, wskazujące na mniejszą zapadalność na danym terenie i mniejsze ryzyko „świeżego” zakażenia u dawców krwi).

Analiza źródeł zakażenia, w szczególności u dawców wielokrotnych oraz zakażonych w okienku serologicznym stwarza szansę na uzyskanie danych pozwalających na aktualizację materiałów informacyjnych dla dawców oraz kwestionariuszy wykorzystywanych w trakcie procedury kwalifikacji.

Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje.

Finansowanie/Financial support

Nie występuje.

Etyka/Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

PIŚMIENNICTWO / REFERENCES

- [1] Brojer E, red. Czynniki zakaźne przenoszone przez krew. OINPHARMA: Warszawa; 2008.
- [2] Poszwiński P, Bragiel I, Kacperska E. Detection of HB antigen in blood preparations. *Acta Haematol Pol* 1974;5:133–136.
- [3] Moraczewska Z, Seyfriedowa H, Kacperska E, et al. HIV-1 infection in blood donors and blood recipients. *Przeegl Epidemiol* 1990;44:149–154.
- [4] Głowska-Moraczewska Z, Kacperska E, Seyfried H. Evaluation of screening and complementary tests for anti-HCV antibodies. *Acta Haematol Pol* 1993;24:273–280.
- [5] Brojer E. Implementation of donor screening for infectious agents transmitted by blood by nucleic acid technology in Poland. *Vox Sang* 2005;89:267–268.
- [6] Głowska-Moraczewska Z, Brojer E, Medyńska J, Grabarczyk P. Analiza częstości i źródeł zakażenia HCV u chorych hematologicznych. *Acta Haematol Pol* 1997;28:283–288.
- [7] Kleinman SH, Lelie N, Busch MP. Infectivity of human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus and risk of transmission by transfusion. *Transfusion* 2009;49:2454–2489.
- [8] Brojer E, Grabarczyk P, Liszewski G, et al. Characterization of HBV DNA positive/HBsAg negative blood donors identified in the Polish NAT screening program. *Hepatology* 2006;44:1666–1674.
- [9] Magdzik WW. Hepatitis epidemiology in Poland, Central and Eastern Europe and the newly independent states. *Vaccine* 2000;18:S13–S16.
- [10] Grabarczyk P, Seyfried H, Brojer E, et al. HBsAg detection in blood donors in Poland, 1995–2004. *J Transf Med* 2009;1:20–25.
- [11] Kuśmierczyk J, Zatorska J, Ras J, et al. Prevalence of anti-HBc antibodies in blood donors in the South region of Poland. *Vox Sang* 2006;9:56.
- [12] Candotti D, Grabarczyk P, Ghiazza P, et al. Epidemiology and molecular characterization of occult hepatitis B infection (OBI) in European asymptomatic blood donors. *J Hepatol* 2008;49:537–547.
- [13] Grabarczyk P, Kopacz A, Liszewski G, et al. Polish Blood Transfusion Service Viral Study Group Effectiveness of various mini pool NAT systems for HBV detection in blood donors. *Transfusion* 2009;49:1494–1495.
- [14] Grabarczyk P, van Drimmelen H, Kopacz A, et al. Head to head comparison of two transcription mediated amplification assay versions for detection of hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type 1 in blood donors. *Transfusion* 2013 Apr 17. doi:10.1111/trf.12190. [Epub ahead of print].
- [15] Łętowska M, red. Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi. Warszawa: Instytut Hematologii i Transfuzjologii; 2011.
- [16] Weusten J, Vermeulen M, van Drimmelen H, Lelie N. Refinement of a viral transmission risk model for blood donations in seroconversion window phase screened by nucleic acid testing in different pool sizes and repeat test algorithms. *Transfusion* 2011;51:203–215.
- [17] Vermeulen M, Dickens C, Lelie N, et al. Hepatitis B virus transmission by blood transfusion during 4 years of individual-donation nucleic acid testing in South Africa: estimated and observed window period risk. *Transfusion* 2012;52:880–892.
- [18] Satake M, Taira R, Yugi H, et al. Infectivity of blood components with low hepatitis B virus DNA levels identified in a look back program. *Transfusion* 2007;47:1197–1205.
- [19] Levicnik-Stezinar S, Rahne-Potokar U, Candotti D, et al. HBs positive occult hepatitis B virus carrier blood infectious in two transfusion recipients. *J Hepatol* 2008;48:1022–1025.
- [20] Allain JP, Mihaljevic I, Gonzalez-Fraile MI, et al. Infectivity of blood products from donors with occult hepatitis B virus

- infection. *Transfusion* 2013 Jan 30. doi:10.1111/trf.12096. [Epub ahead of print].
- [21] Seyfried H, Brojer E, Grabarczyk P, et al. Analiza częstości markerów zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV) u polskich dawców krwi w latach 1994–2003. *Przeegl Epidemiol* 2005;59:807–814.
- [22] Roth WK, Busch MP, Schuller A, et al. International survey on NAT testing of blood donations: expanding implementation and yield from 1999 to 2009. *Vox Sang* 2012;102:82–90.
- [23] Grabarczyk P, Gronowska A, Brojer E, et al. Sequence analysis conformation of transfusion-transmitted hepatitis C by red cells which tested negative by mini-pool HCV NAT. *Transfusion* 2007;47:1102–1104.
- [24] Grabarczyk P, Czerwiński M, Rosińska M, et al. Risk factors for infection among recently HCV infected blood donors in Poland. 23rd Regional Congress of the ISBT, Amsterdam, The Netherlands, from June 2-5, 2013. *Vox Sang* 2013; 105:336.
- [25] Mikulska M, Sulowska E, Grabarczyk P, et al. Częstość zakażeń wirusem HIV w populacji krwiodawców w Polsce w latach 1988–2007. *J Transf Med* 2008;1:20–27.
- [26] Sulowska E, Mikulska M, Grabarczyk P, et al. Analiza molekularnych i serologicznych markerów zakażenia HIV u polskich krwiodawców. *J Transf Med* 2013;6:1–5.
- [27] Bruhn R, Lelie N, Custer B, et al. Prevalence of HIV RNA and antibody in first, lapsed and repeat blood donations across five international regions and relative efficacy of alternative screening scenarios. *Transfusion* 2013. in press.
- [28] Schmidt M, Korn K, Nuebling CM, et al. First transmission of human immunodeficiency virus Type 1 by a cellular blood product after mandatory nucleic acid screening in Germany. *Transfusion* 2009;49:1836–1844.
- [29] Chudy M, Weber-Schehl M, Pichl L, et al. Blood screening nucleic acid amplification tests for human immunodeficiency virus Type 1 may require two different amplification targets. *Transfusion* 2012;52:431–439.
- [30] Müller B, Nübling M, Kress J, et al. How safe is safe: New HIV-1 variants missed by nucleic acid testing. *Transfusion* 2013. in press.
- [31] Foglieni B, Candotti D, Guarnori I, et al. A cluster of human immunodeficiency virus Type 1 recombinant form escaping detection by commercial genomic amplification assays. *Transfusion* 2011;51:719–730.
- [32] Schmidt M, Hourfar MK, Seifried E. HIV-1 realtime detection in two conserved regions increases blood safety. *Vox Sang* 2008;95:308.
- [33] Sulowska E, Mikulska M, Grabarczyk P, et al. Molecular and serological markers of HIV infection in Polish blood donors – detection of “window period” and HIV RNA seropositive individuals but lack of HIV elite controllers. 31st International Congress of the ISBT in joint cooperation with the 43rd Congress of the DGTI, Berlin, Germany, June 26 – 1 July, 2010. *Vox Sang* 2010;99:PP-0570.
- [34] Baylis SA, Fryer JF, Grabarczyk P. Effects of probe binding mutations in an assay designed to detect parvovirus B19: Implications for the quantitation of different virus genotypes. *J Virol Methods* 2007;139:97–99.
- [35] Baylis SA, Buchheit KH. A proficiency testing study to evaluate laboratory performance for the detection of different genotypes of parvovirus B19. *Vox Sang* 2009;97:13–20.
- [36] Grabarczyk P, Kalińska A, Sulowska E, Brojer E. False negative results in high viremia parvovirus B19-samples tested with real-time PCR. *Pol J Microbiol* 2010;59:129–132.
- [37] Koppelman MH, Cuijpers HT, Wessberg S, et al. Multicenter evaluation of a commercial multiplex polymerase chain reaction test for screening plasma donations for parvovirus B19 DNA and hepatitis A virus RNA. *Transfusion* 2012;52: 1498–1508.
- [38] Grabarczyk P, Kopacz A, Liszewski G, et al. Evaluation of the Roche cobas® Taqscreen DPX test for parvovirus B19 DNA genotypes detection in blood donors. 23rd Regional Congress of the ISBT, Amsterdam, The Netherlands, from June 2–5, 2013. *Vox Sang* 2013;105:PP-308.
- [39] Chudy M, Hanschmann KM, Kress J, et al. First WHO International Reference Panel containing hepatitis B virus genotypes A-G for assays of the viral DNA. *J Clin Virol* 2012;55:303–309.
- [40] Manak M, Sina S, Anekella B, et al. Pilot Studies for Development of an HIV Subtype Panel for Surveillance of Global Diversity. *AIDS Res Hum Retrovir* 2012;28:594–606.
- [41] Baylis SAML, Padley DJ, Heath AB, Yu MW, Group. tCS. Collaborative study to establish a World Health Organization International genotype panel for parvovirus B19 DNA nucleic acid amplification technology (NAT)-based assays. *Vox Sang* 2012;102:204–211.
- [42] Satake M, Hoshi Y, Taira R, et al. Symptomatic parvovirus B19 infection caused by blood component transfusion. *Transfusion* 2011;51:1887–1895.
- [43] Quigley J, Doyle B, Burke E, et al. Non immune hydrops due to parvovirus B19 in pregnancy: a case report. 23rd Regional Congress of the ISBT, Amsterdam, The Netherlands, June 2-5, 2013. *Vox Sang* 2013;105:P-553.