

Wirus Zachodniego Nilu a bezpieczeństwo przetoczeń krwi i jej składników

West Nile Virus as a threat to transfusion safety

Katarzyna Tkaczuk¹, Elżbieta Lachert², Ewa Sulkowska¹,
 Ryszard Pogłód², Magdalena Łętowska², Piotr Grabarczyk¹

¹Zakład Wirusologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii

²Zakład Transfuzjologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Streszczenie

Wirus Zachodniego Nilu (WNV) w XXI wieku znalazł się z centrum zainteresowania ze względu na związaną z wielkimi zdolnościami adaptacyjnymi ekspansję na wszystkich kontynentach. Obserwowany jest znaczący wpływ tego, znanego od 75 lat, czynnika chorobotwórczego na ekosystemy, a także na gospodarkę ludzką, a co szczególnie istotne, stanowi on zagrożenie dla zdrowia publicznego.

W publikacji dokonano przeglądu obecnej sytuacji epidemiologicznej w kontekście aktualnej wiedzy dotyczącej warunków rozprzestrzeniania się WNV w środowisku, a zwłaszcza przeniesienia wirusa na ludzi. Przedstawiono opis przebiegu zakażenia WNV oraz podsumowano dotychczasowe ustalenia dotyczące wartości metod diagnostycznych w identyfikacji osób zakażonych zarówno chorych, jak i bezobjawowych, np. dawców tkanek, w tym krwi i jej składników. Przedstawiono najważniejsze metody zapobiegania zakażeniom m.in. przez odpowiednią kwalifikację dawców, identyfikację osób zakażonych, efektywność obecnie stosowanych metod inaktywacji oraz perspektywy dostępności skutecznych szczepionek.

Słowa kluczowe: Wirus Zachodniego Nilu, WNV, dawcy krwi, bezpieczeństwo przetoczeń

J. Transf. Med. 2013; 6: 69–84

Abstract

In the twenty-first century the West Nile Virus (WNV) has become the focus of attention as result of its expansion on all continents associated with its great adaptability. This pathogen has been known for 75 years but has recently been observed to have significant impact on ecosystems and human economy. It has therefore become a serious threat to public health. The paper is a review of the epidemiological condition in light of current knowledge on the environmental spread of WNV and particularly on the transmission to humans. We present the course of WNV infection and the review of diagnostic methods which are crucial for proper identification of infected people (both patients and asymptomatic donors of blood and tissues). The major preventive measures have been discussed including restrictive criteria of donor selection, methods of identifying infected persons, effective inactivation methods and availability of effective vaccines.

Key words: West Nile Virus, WNV, blood donors, transfusion safety

J. Transf. Med. 2013; 6: 69–84

Adres do korespondencji: mgr Katarzyna Tkaczuk, Zakład Wirusologii IHiT, ul. Indiry Gandhi 14, 02–776 Warszawa, e-mail: ktkaczuk@ihit.waw.pl

Wstęp

Wirus Zachodniego Nilu (WNV, *West Nile Virus*) został po raz pierwszy wyizolowany z krwi chorej kobiety w prowincji Zachodni Nil w Ugandzie w roku 1937 [1]. Niektórzy badacze podejrzewają, że wirus ten krążył w środowisku naturalnym dużo wcześniej i był jedną z przyczyn zapalenia mózgu i śmierci Aleksandra Wielkiego [2]. Do końca ubiegłego wieku nie zaliczano go jednak do grupy istotnych czynników chorobotwórczych — odnotowywano jedynie pojedyncze przypadki zapalenia mózgu u ludzi w części Afryki, Azji oraz Europy i wykazywał nieznaczny wpływ na środowisko przyrodnicze. Postrzeżenie WNV zmieniło się w ciągu pierwszych lat nowego stulecia, kiedy pojawienie się tego wirusa w Ameryce Północnej spowodowało chorobę u kilkudziesięciu tysięcy osób, a liczba zmarłych w wyniku zakażenia w ciągu dekady epidemii przekroczyła 1000. Pojawienie się wirusa wywołało istotne zmiany w środowisku naturalnym powodując straty w ekosystemach (m.in. padanie dzikich ptaków), w gospodarce ludzkiej przez wywoływanie chorób zwierząt gospodarskich (np. koni, ptactwa domowego). Rozwój epidemii w pierwszych latach nowego tysiąclecia wiązał się z pojawieniem i rozprzestrzenieniem się bardziej wirulentnych szczepów wirusa. Wirus Zachodniego Nilu okazał się istotny dla bezpieczeństwa przetoczeń krwi i jej składników. W Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej i w Kanadzie szczegółowo udokumentowano w ostatnich latach ponad 30 przypadków zakażeń potransfuzyjnych, a w ich następstwie poważnych powikłań, niekiedy prowadzących nawet do śmierci [3]. W celu ograniczenia ryzyka zakażeń przez przetoczenia w niektórych krajach wprowadzono badania przesiewowe u dawców krwi.

Ostatnie dane epidemiologiczne świadczą o utrzymywaniu się epidemii w niektórych regionach Europy oraz w Ameryce Północnej; można mówić nawet o jej nasilaniu się na pewnych obszarach. Choć dotychczas nie opisano w Polsce przypadków zakażenia ludzi, to jednak badania zwierząt wskazują na krążenie tego wirusa w ekosystemie. Zmiany klimatyczne oraz zdolności adaptacyjne wirusa, które przyczyniły się do obecnej sytuacji epidemiologicznej, są powodem zainteresowania wirusem także w Polsce.

W pracy przedstawiono aktualną sytuację epidemiologiczną ze szczególnym uwzględnieniem Europy oraz przeanalizowano najważniejsze sposoby zapobiegania przeniesieniu WNV przez krew,

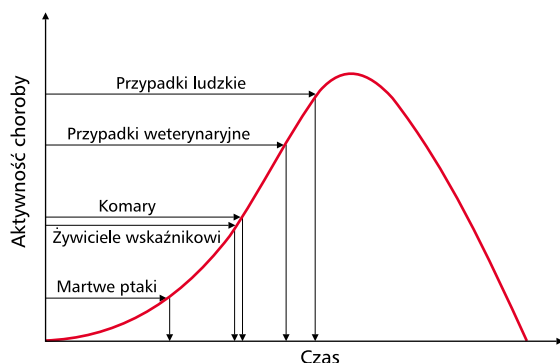
przeszczepy narządów i tkanek w świetle aktualnych rekomendacji krajowych i międzynarodowych.

Biologia WNV

Budowa i klasyfikacja taksonomiczna

Wirus Zachodniego Nilu należy do rodziny *Flaviviridae* obejmującej także wirusa denga, wirusa japońskiego zapalenia mózgu czy wirusa żółtej gorączki, z rodzaju *Flavivirus*. Należy do serokompleksu japońskiego zapalenia mózgu, w którego skład wchodzi kilka istotnych pod względem klinicznym wirusów, odpowiedzialnych za ludzkie przypadki zapalenia mózgu: wirus japońskiego zapalenia mózgu, wirus zapalenia mózgu St. Louise, wirus zapalenia mózgu Murray Valley i wirus Kunjin (podtyp WNV występujący w Australii). Ścisłe pokrewieństwo antygenowe tych wirusów odpowiada za krzyżowe reakcje serologiczne [4]. Takie reakcje należy wziąć pod uwagę również w stosunku do występującego w Polsce endemicznie wirusa kleszczowego zapalenia mózgu (KZM).

Wirus Zachodniego Nilu zaliczany jest do grupy arbowirusów, czyli wirusów przenoszonych przez stawonogi [5]. Wirion WNV ma charakter otoczkowy i jest średnich rozmiarów (40–60 nm średnicy), zawiera pojedynczą cząsteczkę RNA o długości około 11 000 nukleotydów kodującą jedną poliproteinę. Poliproteina w procesie dojrzewania jest cięta przez proteazy wirusowe oraz gospodarza, w wyniku czego uwalniane są białko kapsydu, białko śródbłonkowe i otoczki oraz siedem białek niestrukturalnych. Uważa się, że wniknięcie wirusa do komórki gospodarza następuje w wyniku endocytozy zapoczątkowanej przez oddziaływanie wirusa z receptorem na powierzchni komórki, najprawdopodobniej glikoproteiną E. W oddziaływaniach między wirusem a komórką mogą także uczestniczyć inne cząsteczki (DC-SIGN [*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*], DC-SIGNR [*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin-related*], niektóre integryny) [6]. Wyróżnia się dwie linie wirusa: 1 — bardziej wirulentną, która jest odpowiedzialna za obecną epidemię wśród ludzi oraz zwierząt; oraz linię 2, której cykl przenoszenia dotyczy przede wszystkim zwierząt. Zakażenia linią 2 opisywane były do niedawna jedynie na Madagaskarze oraz na terenie Afryki Subsaharyjskiej, w ostatnich latach jednak zauważono gwałtowny wzrost liczby zakażeń wśród zwierząt w Europie Centralnej — w Północnych Włoszech, w Austrii, na Węgrzech



Na podstawie Estimated sensitivity of West Nile virus surveillance methods, 2003. CDC (Centers for Disease Control and Prevention) <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/misc/slides/roehrig/slide27.htm>

Rycina 1. Szacowana czułość metod nadzoru Wirusa Zachodniego Nilu

Figure 1. Estimated sensitivity of WNV surveillance methods

i w Grecji [7, 8] oraz przypadki zakażenia tą formą wirusa u ludzi [9–11].

Cykl życiowy

Pierwotnym rezerwuarem wirusa są ptaki tropikalne i wędrowne, które, pomimo bardzo wysokiego poziomu wirēmii i długotrwałego zakażenia, nie chorują. Inaczej jest z ptakami żyjącymi poza obszarami endemicznego występowania wirusa. Ptaki te są bardzo podatne na zakażenie, które objawia się osłabieniem, drgawkami, ataksją, zmianą wyglądu (np. ułożenie szyi w kształt litery S) oraz nietypowym zachowaniem (najczęściej obserwuje się zataczanie kół podczas pływania) [12, 13]. Masowe padanie ptaków, a następnie innych zwierząt, najczęściej koni, zazwyczaj wskazuje na wysokie prawdopodobieństwo występowania w bliskiej przyszłości zachorowań wśród ludzi (ryc. 1) [12].

Wirus zakaża ponad 300 gatunków ptaków [14]. Wektorem dla WNV są żywiące się krwią muchówki, przede wszystkim komary i meszki. Wirus jest przenoszony przez ponad 150 gatunków komarów, spośród których 12 występuje w Polsce. Szczególnie istotne dla szerzenia się zakażenia wirusem są komary żywiące się zarówno krwią ptaków, jak i ssaków (np. *Culex spp.*, *Culiseta spp.*, *Anopheles spp.*) [12, 15]. Komary zakażają się WNV, żywiąc się krwią zarażonych ptaków i to właśnie u ptaków (za wyjątkiem kilku gatunków), wirus produkuje wystarczająco wysokie miana wirēmii, aby zainfekować komary [16].

Wirus namnaża się w nabłonku jelita środkowego komara. Następnie za pośrednictwem he-

molimfy rozprzestrzenia się po całym organizmie, w tym do gruczołów ślinowych, gdzie wydzielany jest w wysokim stężeniu do śliny komara. Ze złożonych przez samicę komara jaj wykluwają się osobniki zakażone wirusem [13, 17].

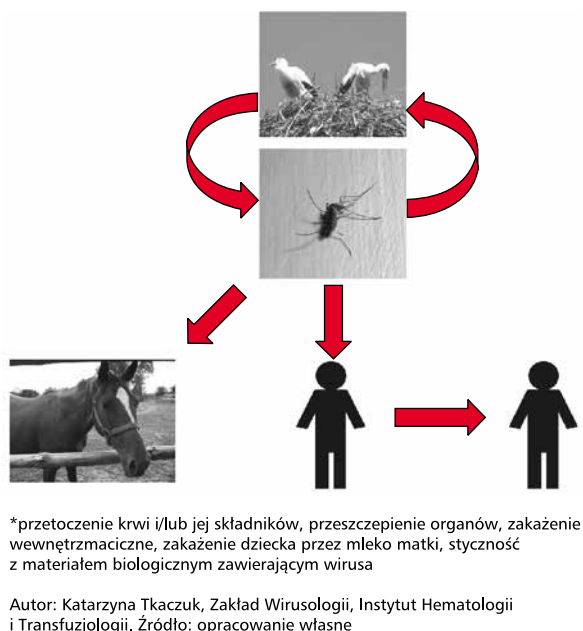
Długość okresu, kiedy możliwe jest przeniesienie wirusa w ciągu roku, zależy od klimatu. Na terenach, gdzie panuje klimat umiarkowany ciepły morski i kontynentalny warunki do namnażania się wirusa mogą występować w okresie letnim, podczas upałów. W obszarach tropikalnych i subtropikalnych transmisja wirusa trwa nieustannie [12]. Występowanie odpowiedniej temperatury jest czynnikiem koniecznym i ograniczającym zdolność komarów do transmisji wirusa. Dlatego lokalne temperatury podczas cyklu żywienia komarów są istotne dla ustalenia, czy wirus będzie się rozprzestrzeniał [18].

Do niedawna uważano, że aby wirus mógł się namnażać w organizmie komara, konieczna jest temperatura co najmniej 22°C przez całą dobę w ciągu 12 dni [19]. Ostatnio przeprowadzone badania wykazały, że możliwości adaptacyjne wirusa są większe niż sądzono. Obecnie uważa się, że warunkiem do namnażania się wirusa jest temperatura nie niższa niż 14,3°C przez 12-dniowy okres zerowania wektora [18].

Udowodniono ponadto, że wraz ze wzrostem temperatury otoczenia skracą się czas niezbędny dla uzyskania przez komara zdolności przenoszenia wirusa. Wykazano, że nawet niewielki wzrost temperatury może mieć stosunkowo duży wpływ na zwiększenie transmisji WNV [20]. Nowe obserwacje, dotyczące zależności między temperaturą otoczenia a przeniesieniem zakażenia WNV przez komary, tłumaczą fakt występowania zakażeń wśród ludzi w klimacie chłodniejszym m.in. w Kanadzie, gdzie tylko w roku 2012 odnotowano w sumie 450 klinicznych przypadków i bezobjawowych infekcji WNV. Najwięcej zakażeń zgłoszono w prowincji Ontario, w aglomeracji Toronto [21]. W okresie od czerwca do września wymagana minimalna temperatura, jak początkowo sądzono powyżej 22°C, wystąpiła tam tylko dwukrotnie, przeważały za to długie okresy z temperaturą minimalną nie mniejszą niż 14,3°C [22].

Zakażony komar, żywiąc się krwią ptaków, ssaków i innych zwierząt, zakaża je WNV. Ssaki są dla wirusa żywicielem przypadkowym. Cykl transmisji wirusa przedstawiono na rycinie 2.

Uważa się, że w naturalnych warunkach przeniesienie zakażenia z człowieka na człowieka nie występuje. Możliwe jest jednak przeniesienie wirusa poprzez przetoczenie krwi i/lub jej składników, przeszczepienie organów; udokumentowano także



Rycina 2. Cykl przenoszenia Wirusa Zachodniego Nilu

Figure 2. Transmission cycle of West Nile Virus

przypadki przeniesienia zakażenia wewnątrzmacicznie, zakażenie dziecka przez mleko matki oraz poprzez styczność z materiałem biologicznym zawierającym wirusa (pracownicy laboratoryjni) [23].

Przebieg zakażenia WNV u ludzi

Przebieg zakażenia WNV ma istotne znaczenie dla możliwości identyfikacji zakażonych osób, które zgłaszają się, aby oddać krew. Większość, bo około 80% przypadków zakażenia WNV, stanowią infekcje bezobjawowe, w takich sytuacjach bez zastosowania swoistych testów diagnostycznych nie ma możliwości uniknięcia pobrania krwi od osoby zakażonej. U około 20% zakażonych rozwija się łagodna choroba przebiegająca z gorączką, tzw. gorączką Zachodniego Nilu (WNF, *West Nile Fever*). Podwyższona ciepłota ciała utrzymuje się od 3 do 6 dni i nie ma charakteru specyficznego, jednak jest wystarczającym powodem, aby czasowo zdyskwalifikować dawcę. Ciężka neuroinwazyjna postać choroby (WNND, *West Nile Neurological Disease*) dotyka mniej niż 1% wszystkich zakażonych. Śmiertelność w tej grupie wynosi około 10%. Czynnikiem ryzyka dla ciężkiego przebiegu infekcji WNV są wiek osoby zakażonej powyżej 50 lat oraz obniżona odporność [24]. Ciężka neuroinwazyjna postać choroby (WNND) może manifestować się zapaleniem mózgu, zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych oraz ostrym porażeniem wiotkim

(ang. *West Nile Poliomyelitis*). Do objawów WNND należą: bóle głowy, wysoka gorączka, sztywność karku, uczucie drętwienia, dezorientacja, śpiączka, drgawki, osłabienie mięśni, a nawet porażenie [25, 26]. Część osób po przejściu WNND uskarża się na zaburzenia pamięci i koncentracji, zmęczenie, depresję, bóle głowy, osłabienie siły mięśniowej kończyn, zaburzenie zdolności motorycznych, zaburzenie funkcji wykonawczych utrzymujące się przez miesiące, a nawet lata po zakażeniu wirusem [27, 28]. Dodatkowo, amerykańskie badania dowodzą, że w przeciągu kilku lat od infekcji u osób z przewlekłymi objawami po zakażeniu WNV istnieje prawdopodobieństwo wystąpienia przewlekłego zakażenia nerek, które w efekcie doprowadzić może do przewlekłej niewydolności nerek i śmierci. Autorzy sugerują, że grupę ryzyka dla tego typu infekcji stanowią osoby starsze z nadciśnieniem tętniczym [29].

Okres od chwili zakażenia WNV do wystąpienia ewentualnych objawów klinicznych wynosi 3–14 dni. Wiremia pojawia się w ciągu 1–3 dni od chwili zakażenia i trwa zazwyczaj nie dłużej niż 10 dni. W zakażeniach objawowych wiremia obserwowana jest już przed pojawieniem się objawów choroby [24].

Genetyczne cechy organizmu zakażonego, takie jak mutacje czy delecje w genach CCR5, IRF-3, OAS-1, allele HLA klasy I (HLA-A*68, C*08) są związane z neuroinwazyjnym przebiegiem zakażenia WNV. Wyniki ostatnio przeprowadzonych badań sugerują także związek między grupami krwi a przebiegiem zakażenia. Występowanie grupy A układu ABO oraz brak antygenu D z układu Rh należą do czynników ryzyka rozwoju choroby WNV [30–34].

Wciąż nie ma pewności, które subpopulacje komórek krwi są atakowane przez WNV. Uważa się, że wirus ma zdolność adhezji do erytrocytów krwi obwodowej, ponieważ stężenie wirusa jest większe przynajmniej o jeden rząd wielkości w osoczu pobranym od osób zakażonych w porównaniu z koncentratem krwinek czerwonych (KKCz). W hodowlach komórkowych *in vitro* udowodniono, że możliwe jest zakażenie Wirusem Zachodniego Nilu makrofagów powstałych z monocytów i obserwowano aktywność replikacyjną wirusa przez wykazanie produkcji ujemnych nici RNA w tych komórkach. Oddziaływania wirusa z komórkami krwi oraz jego prawdopodobna replikacja powoduje, że tylko w okresie okienka serologicznego stężenie wirusa jest większe w osoczu niż w pełnej krwi. U osób serododatnich następuje odwrócenie proporcji i znacząco większe stężenie wirusa jest wykrywane w pełnej krwi. Te spostrzeżenia w przyszłości mogą mieć istotne znaczenie dla strategii prowadzenia diagnostyki zakażeń WNV [35–37].

Epidemiologia WNV

Wirus został pierwotnie wyizolowany w 1937 roku w Afryce, w Ugandzie. Na początku lat 50. Wykryto go u ptaków, ludzi i komarów w Egipcie. Obserwacje z kolejnych lat skłaniają do uznania WNV za najszybciej rozprzestrzeniającego się flawiwirusa w Afryce, Azji i Europie. W roku 1957 WNV wywołał epidemię u ludzi w Izraelu.

W 1964 r. wirus po raz pierwszy dotarł do Europy w rejon delty Wołgi w Rosji, gdzie zaobserwowano zakażenie ludzi oraz delty Rodanu we Francji, gdzie doszło do zakażenia komarów. Pierwsza duża epidemia WNV wśród ludzi miała miejsce w Rumunii w 1996 roku. Odnotowano wówczas ponad 800 klinicznych przypadków choroby neuroinwazyjnej, w 393 potwierdzono zakażenie WNV. Zmarło wówczas 17 osób [38, 39].

Do końca lat 90. obecność wirusa stwierdzono u komarów/ssaków/ludzi m.in. w Czechach, we Włoszech, na Słowacji, Ukrainie, Białorusi, w Hiszpanii, Portugalii. W roku 1999, w Rosji (rejon Wołgogradu i dolny bieg Wołgi), miała miejsce kolejna duża epidemia WNV wśród ludzi. Zachorowało wówczas około 1000 osób, z czego hospitalizowano ponad 800, a 40 zmarło.

W 1999 roku wirus dotarł do Stanów Zjednoczonych, doprowadzając do masowego padania ptaków oraz występowania zachorowań i zgonów wśród zwierząt i ludzi. O dynamice epidemii świadczy fakt, że rozpoczęła się ona na wschodnim wybrzeżu i w ciągu zaledwie 4 lat dotarła do zachodniego krańca kontynentu. W okresie od 1999 do 2012 roku WNV spowodował ponad 37 000 zakażeń wśród ludzi w samych Stanach Zjednoczonych. Prawie 21 000 zakażeń stanowiły przypadki bez zajęcia układu nerwowego, natomiast około 16 000 zakażeń to przypadki neuroinwazyjnej postaci choroby, w tym ponad 1400 zgonów (CDC <http://www.cdc.gov/westnile/statsMaps/cumMapsData.html>).

Obserwowano istotny wpływ wirusa na środowisko naturalne — był on szczególnie widoczny w przypadku licznych gatunków ptaków. W przypadku niektórych gatunków doszło do załamania liczebności ptaków nawet poniżej 50%. Obserwacje te dotyczyły m.in. strzyżyków i drozdów, nie wszystkie populacje odrodziły się po wygaśnięciu epidemii [40]. W latach 2002–2007 WNV był przyczyną kilku tysięcy zachorowań rocznie.

W 2003 roku w Stanach Zjednoczonych pojawiła się największa epidemia WNV wśród ludzi. Odnotowano wówczas 9862 zachorowania i 264 zgony z powodu zakażenia WNV. W ciągu kilku lat, wirus rozprzestrzenił się na terytorium całej

Ameryki Północnej, pojawiając się w 2002 roku w Kanadzie i 2003 roku w Meksyku. W 2003 roku wirus został przeniesiony do Ameryki Południowej (Kolumbia, Wenezuela) i na niektóre z Wysp Karaibskich (Kuba, Haiti) [41, 42].

W tym czasie, w Europie przypadki zakażenia WNV wśród ludzi występowały sporadycznie, aż do roku 2010, kiedy odnotowano 262 przypadki potwierdzone i/lub prawdopodobne w Grecji, 57 przypadków potwierdzonych w Rumunii, 413 przypadków potwierdzonych w Rosji (rejon Wołgogradu), 19 przypadków potwierdzonych na Węgrzech, kilka przypadków w Hiszpanii i we Włoszech oraz w sąsiadującej z Unią Europejską Turcji (47 przypadków potwierdzonych i/lub prawdopodobnych) oraz Izraelu (ponad 20 potwierdzonych przypadków) [43].

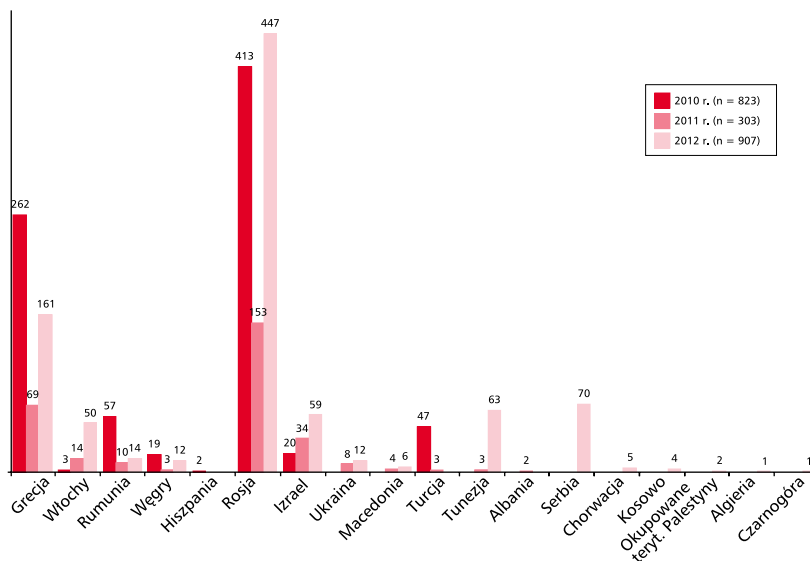
W roku 2011, w sezonie przenoszenia zakażenia, trwającym od czerwca do listopada, odnotowano 303 przypadki WNF w krajach Unii Europejskiej i krajach sąsiadujących. Najwięcej przypadków zarejestrowano w Rosji — 153, Grecji — 69, Izraelu — 34 i we Włoszech — 14.

Według danych z 27 września 2012 roku, liczba zgłoszonych ludzkich przypadków WNF była ponad dwukrotnie większa (665 przypadków) niż w ciągu całego sezonu przenoszenia zakażenia w roku 2011 (303 przypadki). Stanowiło to ponad 450 przypadków zakażenia więcej niż w analogicznym okresie 2011 roku. W całym sezonie przenoszenia zakażenia (lipiec–listopad) zgłoszono 907 przypadków WNF wśród ludzi, najwięcej w Rosji — 447 przypadków, Grecji — 161, Serbii — 70, Tunezji — 63, Izraelu — 59 i we Włoszech — 50. W 2012 roku zaobserwowano rozszerzenie obszaru występowania wirusa na kraje byłej Jugosławii (ryc. 3, 4) [44].

W roku 2013, do końca sierpnia zarejestrowano 68 przypadków WNF na terenie Unii Europejskiej oraz 256 w krajach z nią sąsiadujących. Niepokojące są doniesienia o przypadkach zakażeń ludzi na obszarach położonych coraz bliżej granic Polski, w Okręgu Żytomierskim na Ukrainie, w odległości około 400 km od wschodniej granicy naszego kraju, oraz w północnych Węgrzech i Rumunii (http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west_nile_fever/West-Nile-fever-maps/Pages/index.aspx). Obecnie wirus swoim zasięgiem obejmuje Afrykę, Europę, Środkowy Wschód, Azję, Australię (Kunjin) oraz Amerykę Północną i Południową [45].

Badania epidemiologiczne WNV w Polsce

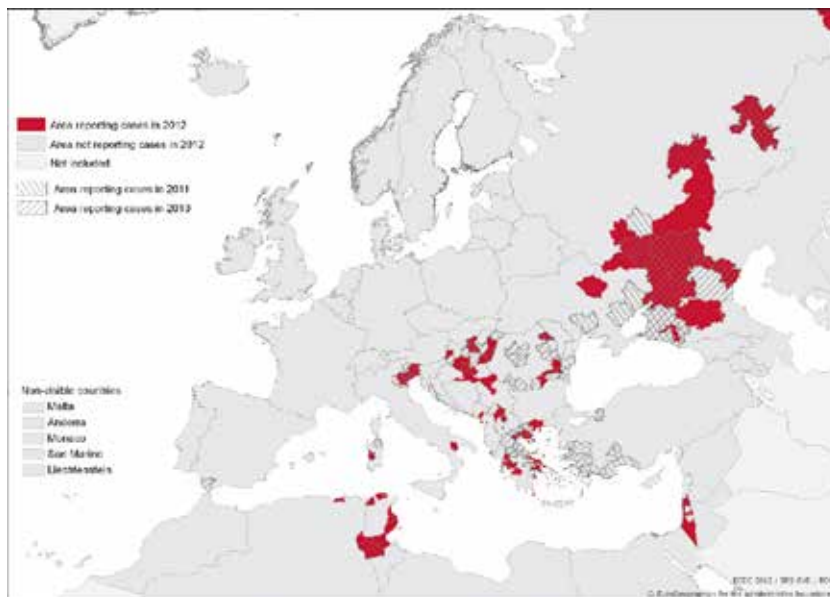
Pierwsze doniesienia o potencjalnej obecności WNV w Polsce pojawiły się już w połowie lat 90.



Na podstawie danych ECDC
http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west_nile_fever/West-Nile-fever-maps/Pages/index.aspx

Rycina 3 . Liczba zgłoszonych ludzkich przypadków Gorączki Zachodniego Nilu w Unii Europejskiej i krajach sąsiadujących w 2010, 2011 i 2012 roku

Figure 3. Number of reported cases of West Nile fever for the UE and neighbouring countries in 2010, 2011 and 2012



Źródło: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west_nile_fever/West-Nile-fever-maps/Pages/index.aspx

Rycina 4 . Mapa zgłoszonych ludzkich przypadków Gorączki Zachodniego Nilu w Unii Europejskiej i krajach sąsiadujących w 2010, 2011 i 2012 roku

Figure 4. Map of reported cases of West Nile fever for the UE and neighbouring countries in 2010, 2011 and 2012

XX wieku, kiedy na przełomie roku 1995 i 1996 w Łomiankach, w miasteczku położonym na obrzeżach Warszawy i Puszczy Kampinoskiej wykazano obecność przeciwciał przeciwko WNV u 2,8% wróbli domowych oraz 12,1% wróbli mazurków [23].

W 2006 roku badano obecność przeciwciał wśród koni, ptactwa domowego i wolno żyjącego. U żadnego z 78 badanych koni nie wykryto przeciwciał przeciwko WNV. Swoistych markerów zakażenia nie wykryto również u żadnej z 20 badanych kur

domowych. W populacji 97 wolno żyjących ptaków, należących do 10 gatunków, swoiste przeciwciała stwierdzono u 5 osobników (5,2%): u 3 bocianów białych, u łabędzia niemego oraz u wrony. Cztery z przebadanych ptaków pochodziły z Ptasiego Azylu w warszawskim Ogrodzie Zoologicznym [46].

W tym samym roku w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym w Puławach przebadano na obecność RNA wirusa narządy 1 664 padłych dzikich ptaków, które pochodziły z obszaru całej Polski. Badaniami objęto około 150 gatunków ptaków. W badanych próbkach nie wykazano obecności materiału genetycznego WNV [13, 15].

W latach 2004–2009 przeprowadzono również badania na obecność materiału genetycznego wirusa u komarów bytujących na obszarze województwa kujawsko-pomorskiego, warmińsko-mazurskiego, mazowieckiego i podlaskiego. Przebadano 15 400 samic komara z 10 gatunków, z czego połowa tych gatunków jest wektorem WNV. RNA wirusa jednak nie wykryto [47]. Państwowy Instytut Weterynaryjny w Puławach w ponownych badaniach ptaków w latach 2007–2010, badał obecność RNA wirusa wśród ptaków z różnych rejonów Polski. Przebadano mózgi 2 140 dzikich ptaków z 39 gatunków w okresach od wczesnej wiosny do późnej jesieni. I tym razem nie stwierdzono obecności RNA WNV w badanych próbkach [48].

Dotychczasowe badania dotyczące ludzi mają charakter ograniczony. W okresie od czerwca do sierpnia 2005 roku, w Klinice Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji Akademii Medycznej w Białymstoku badano obecność przeciwciał klasy IgM przeciwko WNV (test immunoenzymatyczny ELISA [*enzyme-linked immunosorbent assay*]) w surowicy osób, które zgłaszały się do Kliniki z ostrymi stanami gorączkowymi. Projektem objęto 39 pacjentów, u których dodatkowo analizowano obecność przeciwciał przeciwko występującemu w Polsce endemicznie wirusowi kleszczowego zapalenia mózgu (KZM) oraz wirusowemu zapaleniu wątroby typu C (HCV). Badania te wykonano w celu wykrycia ewentualnych zakażeń innymi flawiwirusami i wykluczenia reakcji krzyżowych. U jednej osoby (2,6%), 55-letniej kobiety z nawracającą gorączką, bólami głowy i mięśni stwierdzono wysoki poziom przeciwciał klasy IgM przeciwko WNV i boreliozie. Badania w kierunku obecności przeciwciał klasy IgM przeciwko wirusowi KZM i HCV były ujemne. Obraz kliniczny choroby odpowiadał symptomatologii WNV. Pacjentka nie wyjeżdżała za granicę, co może świadczyć o obecności wirusa na terytorium Polski. Przypadek ten jednak nie został ostatecznie potwierdzony laboratoryjnie [23].

Kolejnym badaniem, tym razem na obecność przeciwciał klasy IgG przeciwko WNV w surowicy, poddano 93 pracowników leśnych z województwa świętokrzyskiego i podlaskiego, którzy ze względu na charakter wykonywanej pracy doświadczali częstych ukąszeń przez komary, kleszcze i inne owady. Żadna z osób nie przechodziła kleszczowego zapalenia mózgu, nie miała nagłego stanu gorączkowego i nie przebywała wcześniej na terenie Ameryki Północnej, Azji i Afryki. Tak jak w poprzednim badaniu dodatkowo analizowano obecność przeciwciał przeciwko KZM oraz HCV. Większość badanych (84 osoby — ok. 90%) była szczepiona przeciwko KZM. Z 93 próbek, w 29 (31%) otrzymano dodatnie wyniki w kierunku WNV w metodzie ELISA. Zostały one następnie poddane weryfikacji metodą immunofluorescencji pośredniej (IFA) w Krajowym Referencyjnym Laboratorium dla chorób odzwierzęcych w Budapeszcie na Węgrzech. Swoistość pierwotnego wyniku reaktywnego potwierdzono w 5 próbkach, z czego w 2 wykryto dodatkowo IgG anty-KZM, a w pozostałych 3 badanie na obecność tych przeciwciał dało wynik wątpliwy. Interpretując te wyniki, należy pamiętać, że wśród chorych, którzy byli szczepieni przeciwko innym flawiwirusom, fałszywie dodatnie wyniki na obecność przeciwciał klasy IgG WNV mogą dochodzić nawet do 35% [12].

System monitorowania zakażeń WNV w Europie

Ludzkie przypadki zakażenia WNV zgłaszane są do Komisji Europejskiej poprzez System Wczesnego Ostrzegania i Reagowania (EWRS, *Early Warning Response System*), którym zarządza Europejskie Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (ECDC, *European Centre for Disease Prevention and Control*) [49].

Krajowy punkt kontaktowy wspólnotowego Systemu Wczesnego Ostrzegania i Reagowania dla zapobiegania i kontroli zakażeń oraz chorób zakaźnych działa przy ministrze właściwym do spraw zdrowia [50]. Zgłoszeniu podlegają przypadki potwierdzone, spełniające co najmniej jedno z kryteriów laboratoryjnych opisanych poniżej w części pt. „Diagnostyka zakażenia WNV ze szczególnym uwzględnieniem strategii prowadzenia badań przeglądowych u dawców krwi”.

WNV a bezpieczeństwo przetoczeń i transplantacji

W czasie epidemii w Ameryce Północnej w roku 2002 zaobserwowano pierwsze przypadki zakażeń przeniesionych przez transfuzje krwi

(TT-WNV, *transfusion transmitted WNV*). Opisano wówczas 23 przypadki przeniesienia zakażenia WNV przez przetoczenie: 1) koncentratów krwinek czerwonych (KKCz), w tym także ubogoleukocytar-nych 2) koncentratów krwinek płytkowych (KKP) jak również przez 3) podanie zakażonego świeżo mrożonego osocza (FFP, *fresh frozen plasma*) [51]. Kolejnych 11 przypadków TT-WNV odnotowano w latach 2003–2008. W okresie od 2003 do 2012 r. stwierdzono łącznie 3725 przypadków zakażenia WNV dawców krwi [3].

Początkowo Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*) wprowadziła zalecenie, aby krwi do celów klinicznych nie pobierać od dawców, u których w tygodniu poprzedzającym donację wystąpiła gorączka i ból głowy. Dodatkowo wycofano z użycia FFP przeznaczone do produkcji leków krwiopochodnych z rejonów, gdzie obserwowano szczególne nasilenie epidemii. To działanie pozwoliło prawdopodobnie uniknąć dalszych przypadków zakażenia, bowiem w 3 na prawie 1500 donacji stwierdzono markery ostrego zakażenia WNV [52].

W połowie 2003 roku rozpoczęto badanie NAT (*nucleic acid testing*) w pulach po 6 (PCR, *polimerase chain reaction*) i 16 donacji (TMA, *transcription mediated amplification*), jednak niebawem okazało się, że czułość badania nie była wystarczająca, co powodowało występowanie przypadków potransfuzyjnego zakażenia WNV [53]. Takie przypadki wskazują na wysoką zakaźność WNV przez przetoczenie krwi, zwłaszcza w okresie tzw. okienka serologicznego, przed pojawieniem się przeciwciał na wczesnym etapie zakażenia.

Co prawda większość przypadków TT-WNV dotyczy etapu okienka serologicznego, jednak badania *in vitro* wykazują, że obecność przeciwciał w przetaczanej krwi i jej składnikach nie chroni całkowicie przed przeniesieniem zakażenia [54].

Diagnostyka zakażenia WNV ze szczególnym uwzględnieniem strategii prowadzenia badań przeglądowych u dawców krwi

Diagnostyka laboratoryjna opiera się na różnych technikach, do których należą metody serologiczne, metody biologii molekularnej i metody histologiczne.

Metody serologiczne polegają na badaniu obecności przeciwciał w surowicy oraz płynie mózgowo-rdzeniowym z wykorzystaniem testów immunoenzymatycznych (ELISA), immunofluorescencyjnych (IF, *immunofluorescence*) i neutralizu-

jących (PRNT, *plaque-reduction neutralization test*) i przeciwciał monoklonalnych.

Interpretacja wyniku badania wymaga znajomości przebiegu zakażenia. W odpowiedzi na wniknięcie wirusa do organizmu jako pierwsze pojawiają się przeciwciała klasy IgM. U większości zakażonych osób (około 90%) pojawiają się w ciągu pierwszych 8 dni po wniknięciu czynnika chorobotwórczego do organizmu [55]. Na początku infekcji ich poziom wzrasta, a potem stopniowo maleje, aż do całkowitego zaniknięcia. Przeciwciała IgM mogą utrzymywać się w surowicy do 6 miesięcy lub dłużej [56]. Testy serologiczne typu ELISA są wystandaryzowane i łatwe w wykonaniu, ale należy pamiętać o możliwości wyników fałszywie reaktywnych (z innymi flawiwirusami). Reaktywne wyniki testów serologicznych na obecność przeciwciał muszą być potwierdzone inną metodą, przed postawieniem ostatecznego rozpoznania. Jako test potwierdzenia stosuje się test neutralizacji [57]. Jeżeli wynik badania w kierunku obecności przeciwciał klasy IgM jest ujemny, a objawy wskazują na możliwość infekcji WNV, należy wykonać powtórne oznaczenie w nowej próbce materiału pobranego po kilku dniach. Po około 3 tygodniach od pierwotnego kontaktu z wirusem pojawiają się przeciwciała klasy IgG. Ich stężenie rośnie i stabilizuje się na względnie stałym poziomie. Przeciwciała klasy IgG można badać równolegle z przeciwciałami IgM lub po 2–3 tygodniach od wykrycia IgM WNV. Potwierdzeniem ostrego zakażenia WNV jest wzrost poziomu swoistych przeciwciał neutralizujących w surowicy pacjenta w ostrym okresie choroby i w okresie rekonwalescencji [56].

Metody biologii molekularnej polegają na wykryciu materiału genetycznego wirusa (RNA WNV).

Wykorzystanie technik NAT w diagnostyce zakażeń istotnych klinicznie jest ograniczone, ponieważ RNA WNV utrzymuje się we krwi przez krótki okres, a jego stężenie w organizmie człowieka jest niskie. Wiremia może być wykrywalna już po 2 dniach od zakażenia, długość jej utrzymywania nie jest dokładnie określona. Jest to zwykle okres od 2 do 8 tygodni.

Badanie materiału genetycznego wirusa jest wykorzystywane przede wszystkim do identyfikacji bezobjawowo zakażonych dawców krwi. Do prowadzenia tego typu badań przeglądowych wykorzystywany jest RT-PCR (*real-time polymerase chain reaction*) lub TMA, a badanie należy wykonywać w pojedynczej donacji. Przyjęcie strategii charakteryzującej się najwyższą dostępną czułością wynika z licznych przypadków, kiedy w trakcie badań w pulach (po 6, 8 donacji),

w których uzyskiwano wynik ujemny, w badaniu w pojedynczej donacji otrzymano wynik pozytywny. Badania prowadzone w Stanach Zjednoczonych pokazały, że nawet 5–10% wyników badań przeprowadzonych w pulach może mieć charakter wyników fałszywie ujemnych [58, 59].

W celu zapobiegania rozprzestrzeniania się infekcji przez przetoczenie krwi, w niektórych krajach (np. we Włoszech i w Grecji) wprowadza się badania RNA WNV w krwiodawstwie. Badania te prowadzone są w okresach epidemicznych i jedynie lokalnie. W Stanach Zjednoczonych badanie RNA WNV jest obligatoryjne u wszystkich dawców krwi.

Metody histologiczne polegają na przeprowadzeniu hodowli i wykryciu wirusa w badaniach mikroskopowych.

W Europie strategia diagnostyki zakażenia WNV oparta jest na badaniach serologicznych oraz badaniach NAT [24].

W Polsce laboratoryjne potwierdzenie przypadku WNV powinno być oparte na jednym z następujących kryteriów laboratoryjnych wymienionych w *Decyzji Komisji Europejskiej z dnia 28 kwietnia 2008 r. (zmieniającej decyzję 2002/253/WE w sprawie ustanowienia definicji przypadku w celu zgłaszania chorób zakaźnych do sieci wspólnotowej na podstawie decyzji nr 2119/98/WE Parlamentu Europejskiego i Rady)*:

- izolacja WNV z krwi lub płynu mózgowo-rdzeniowego,
- wykrycie kwasu nukleinowego WNV we krwi lub płynie mózgowo-rdzeniowym,
- znamienne wzrost miana swoistych przeciwciał (IgM) przeciw WNV w płynie mózgowo-rdzeniowym,
- wysokie miano przeciwciał IgM przeciw WNV oraz wykrycie przeciwciał IgG przeciw WNV, oraz potwierdzenie testem neutralizacji. [*eur-lex.europa.eu* <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=O-J:L:2008:159:0046:0090:pl:PDF>]

Rozpoznanie neuroinfekcji opiera się na badaniach płynu mózgowo-rdzeniowego, w którym stwierdza się leukocytozę z dużym odsetkiem komórek wielojądrzastych (od kilkadziesiątu do 2 000), limfopenię, podwyższone stężenie białka, przy prawidłowym stężeniu glukozy. Opracowano również metody hodowli wirusa [56].

Skuteczność aktualnych metod inaktywacji czynników chorobotwórczych w składnikach krwi

Nie opracowano dotychczas metody, która inaktywowałaby wszystkie cząsteczki wirusa,

znajdujące się w składniku krwi. Większość badaczy zajmujących się inaktywacją uważa, że metoda jest skuteczna, gdy obniża ilość wirusa poniżej progu zakaźności, najczęściej o 6 log₁₀. Natomiast FDA wydała oświadczenie, w którym stwierdziła, że metoda redukcji chorobotwórczych czynników zakaźnych może zostać uznana za skuteczną, gdy obniża liczbę czynników zakaźnych w składnikach krwi od 6 do 10 log₁₀. Koncentracja WNV w okienku serologicznym zakażonych dawców może osiągać poziomy nawet 10⁸ do 10¹⁰ wirionów/ml.

Na podstawie oceny ryzyka, dynamiki i zakaźności wirusów można stwierdzić, że w niektórych przypadkach zmniejszenie miana o 6 log₁₀ jest wystarczające, w innych zaś jest za małe lub za duże. W przypadku WNV mało prawdopodobne jest, aby nawet podczas szczytu wirerii koncentracja wirionów osiągnęła poziom wyższy niż 4–5 log/ml, a taki poziom wirerii występuje krótko, zanim wirus zostanie zneutralizowany. Mechanizm ten tłumaczy relatywnie małą liczbę zakażeń WNV po przetoczeniu składników krwi w latach 1999–2002 w Stanach Zjednoczonych, nawet podczas gwałtownego rozprzestrzeniania się wirusa i braku badań przesiewowych (badania przesiewowe wdrożono od 2003 r.). Przeniesienie wirusa drogą krwi następowało wówczas, gdy zakażeni, ale bezobjawowi dawcy zostali zakwalifikowani do oddania krwi.

Po wprowadzeniu testów NAT tylko wczesna faza gwałtownego namnażania się (*ramp-up*) stanowi istotne ryzyko zakażenia. W przypadku WNV metoda inaktywacji, która zmniejsza o 3–4 log/ml koncentrację wirionów tego wirusa, jest w stanie wyeliminować większość cząstek wirusa i związku z tym prawdopodobieństwo przeniesienia choroby jest minimalne [60].

Metoda rozpuszczalnik/detergent (S/D, *solvent/detergent*,) inaktywuje tylko wirusy z lipidową otoczką, która zostaje uszkodzona podczas inkubacji z rozpuszczalnikiem i detergentem, co uniemożliwia wnikanie wirusów do komórki oraz ich namnażanie. Należy się spodziewać, że S/D inaktywuje także WNV, który posiada otoczkę. Tezę tą potwierdziły badania Jakubika i wsp., w których stwierdzono, że WNV jest inaktywowany tą metodą szybko i skutecznie, poniżej granicznej ilości oznaczania, którą stanowi wartość powyżej 5 log₁₀ [61].

Epidemii WNV w roku 2002 w Stanach Zjednoczonych towarzyszyły przypadki jego przeniesienia drogą przeszczepienia narządów oraz transfuzji krwi lub jej składników, co wywołało wzrost niepokoju związanego z bezpieczeństwem produktów krwiopochodnych, otrzymywanych z osocza.

Aby sprawdzić bezpieczeństwo tych produktów, przeprowadzano badania, w których stosowano modelowe wirusy podobne do WNV oraz odmiany WNV wyizolowane podczas epidemii w 1999 r. w Nowym Jorku. Badano skuteczność metod inaktywacji stosowanych powszechnie podczas frakcjonowania osocza takich jak: pasteryzacja wykorzystywana podczas produkcji albuminy, metoda S/D używana do otrzymywania immunoglobulin i koncentratów czynników krzepnięcia oraz inkubacja w niskim pH mająca zastosowanie w przypadku otrzymywania immunoglobulin. Na podstawie otrzymanych wyników badań stwierdzono, że WNV zachowywał się zgodnie z przewidywaniami opartymi na opublikowanych danych, tj. zastosowane metody kompletnie i szybko go inaktywowały [62].

Błękit metylenowy, zastosowany w Systemie Theraflex (Macopharma, Francja) wykazuje wysokie powinowactwo do kwasów nukleinowych, jak również do struktur powierzchniowych wirusów. Zawieszony w osoczu pod wpływem światła widzialnego (590–670 nm) uszkadza za pośrednictwem wolnych rodników tlenowych łańcuchy kwasów nukleinowych wirusów i tym samym przerywa możliwość ich transkrypcji i replikacji. Fotodynamiczna metoda z zastosowaniem błękitu metylenowego inaktywuje szerokie spektrum wirusów w osoczu, aczkolwiek wrażliwość wirusów na inaktywację jest różna. WNV zaliczany jest do grupy czynników zakaźnych bardzo wrażliwych na inaktywację z błękitem metylenowym. Już przy zastosowaniu energii 2040 J/cm², w ciągu 5 min wirusy są całkowicie inaktywowane [63].

Williamson i wsp. stwierdzili, że metoda z błękitem metylenowym inaktywuje WNV o ponad 6,5 log₁₀. Obserwacje te przemawiają za tym, że WNV jest najefektywniej inaktywowanym czynnikiem zakaźnym przy zastosowaniu tej metody [64].

Kolejna metoda inaktywacji czynników chorobotwórczych wykorzystuje fotoaktywność chlorowodoru amotosalenu (pochodna psolarenu), który pod wpływem światła ultrafioletowego (320–400 nm) tworzy nierozzerwalne krzyżowe połączenia z kwasami nukleinowymi czynników chorobotwórczych, przez co uniemożliwia namnażanie czynników chorobotwórczych w FFP i KKP (System Intercept, Cerus, Stany Zjednoczone Ameryki Północnej). Galian i wsp., po przeprowadzeniu badań oceniających stopień inaktywacji WNV (szczypty wyizolowane podczas epidemii w Nowym Jorku) w KKP po zastosowaniu tego Systemu stwierdzili obniżenie liczby kopii WNV o ponad 5,2 log₁₀. W badaniach porównawczych stwierdzono ponadto, że System Intercept jest skuteczny niezależnie od

wariantów wirusa. Inaktywowano KKP „zainfekowane” cząstkami WNV otrzymanymi ze Stanów Zjednoczonych (epidemia w 1999 roku) oraz z Francji. Wyniki badań potwierdziły, że geograficzne pochodzenie odmian WNV nie ma wpływu na efektywność procesu inaktywacji [65]. W badaniach prowadzonych przez Lin i wsp. stwierdzono obniżenie liczby kopii WNV o 5,5 log₁₀ po zastosowaniu Systemu Intercept w przypadku inaktywacji czynników chorobotwórczych w KKP [66].

W metodzie inaktywacji zakaźnych czynników chorobotwórczych z zastosowaniem ryboflawiny (witamina B₂) i światła ultrafioletowego (265–370 nm), dochodzi do zahamowania replikacji czynników chorobotwórczych w wyniku reakcji z kwasami nukleinowymi oraz strukturami powierzchniowymi (System Mirasol PRT, TerumoBCT). Za pomocą tej metody inaktywowane są czynniki chorobotwórcze zarówno w FFP, jak i w KKP. W pracach oceniających skuteczność tej metody w celu do inaktywacji WNV potwierdzono obniżenie liczby cząstek wirusa zarówno w FFP, jak i w KKP o około 5 log₁₀ (5,19 log₁₀) [67].

Oceniając skuteczność metod inaktywacji poszczególnych wirusów, w tym WNV należy wziąć pod uwagę: stopień obniżenia jego zawartości (log₁₀), dynamikę wirusa, stosowane testy przesiewowe i algorytm postępowania przyjęty w danym kraju.

Należy pamiętać o tym, że nawet w przypadku zastosowania NAT dla HIV, HCV i HBV nadal utrzymuje się ryzyko zakażenia w okresie okienka serologicznego. Łącząc zatem zalety testów biologii molekularnej (NAT) do wykrywania wysokiej wiremii z zaletami metod inaktywacji do ograniczania zakaźności związanej z niższą wiriemią można wyeliminować infekcje w okresie okienka i w znacznym stopniu ograniczyć rozprzestrzenianie się nowych czynników chorobotwórczych.

W przypadku WNV wdrożenie jednej z czterech, wyżej wymienionych metod inaktywacji spowoduje znaczne ograniczenie ryzyka związanego z przetoczeniem FFP, zaś inaktywacja czynników zakaźnych z zastosowaniem metody z ryboflawiną lub psoralenem znacznie ogranicza ryzyko przeniesienia WNV, związanego z przetoczeniem KKP. Nadal jednak nie jest dostępna metoda inaktywująca czynniki chorobotwórcze w pełnej krwi oraz w koncentracie krwinek czerwonych.

Szczepienia

Przyszłą potencjalną strategią zapewnienia bezpieczeństwa krwi na terenach epidemicznych może być prowadzenie szczepień, zwłaszcza wśród

Tabela 1. Rzeczywisty poziom ryzyka zakażenia WNV na danym obszarze**Table 1.** The actual risk level of WNV infection in defined area

Obszar ryzyka	Kryteria			
	Warunki (a)	Patogen (b)	Przenoszenie (c)	Powtarzalność (d)
Bez ryzyka	–	–	–	–
Predyspozycji	+	–	–	–
Zagrożony	+	+	–	–
Dotknięty chorobą	+	+	+	–
Endemiczny	+	+	+	+

(a) warunki środowiskowe sprzyjające przenoszeniu WNV na człowieka

(b) obecności patogenu w wektorach i/lub u zwierząt

(c) Transmisja WNV na człowieka

(d) sezonowe nawroty przenoszenia WNV na ludzkich

Na podstawie: The actual risk level of WNV infection in definite area w Meeting Report: Expert consultation on West Nile virus infection, Thessaloniki, 25–26 January 2011 [monograph on the internet]. European Centre for Disease Prevention and Control; 2011 http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1106_MER_WNV_Expert_Consultation.pdf

dawców wielokrotnych. Obecnie trwają prace nad przygotowaniem programu profilaktyki z wykorzystaniem szczepionki. Jedną ze strategii polega na zastosowaniu atenuowanej szczepionki. Konstrukcja szczepionki polega na wstawieniu genu kodującego białko przedbłonowe (prM, pre-membrane) i genu białka otoczki (E) WNV (szczep NY99) do wirusa żółtej gorączki. Do genu E wprowadzono mutacje w trzech miejscach, powodując obniżenie neurowirulencji wirusa [68]. W fazie przedklinicznej udowodniono działanie ochronne szczepienia u chomików i myszy względem typu dzikiego WNV [69, 70]. Podobny efekt uzyskano w badaniach przeprowadzonych na makakach [70]. Wyniki badań klinicznych na ludziach są obiecujące. Wykazują one, że szczepionka jest wysoce immunogenna i bezpieczna zarówno u młodych ludzi, jak i osób powyżej 50. roku życia [71].

Postępowanie w odniesieniu do dawców narządów i tkanek do przeszczepów

Dotychczasowe działania miały zazwyczaj charakter lokalny, okresowy i podyktowane były aktualną sytuacją epidemiologiczną. Pierwsze doniesienie o przeniesieniu zakażenia WNV z zakażonego dawcy aż na czterech biorców zostało opisane szczegółowo w 2003 roku przez Iwamoto i wsp. w prestiżowym czasopiśmie *New England Journal of Medicine* [72]. We Włoszech udokumentowano przeniesienie zakażenia WNV przez przeszczepienie wątroby. W tym kraju przeciwciała do wirusa wykrywane są u 1,2% dawców narządów i tkanek oraz 0,68% dawców krwi.

Wobec tego w regionach, w których wykazano przeniesienie zakażenia na ludzi, jako dodatkowe kryterium kwalifikacji dawców krwi, narządów

i tkanek przyjęto badanie RNA WNV. Dodatkowo dyskwalifikowani są także dawcy, którzy w ciągu 28 dni przed planowanym przeszczepieniem spędzili przynajmniej jedną noc w regionie endemicznego występowania WNV [73].

Zalecenia dotyczące ograniczenia przenoszenia się WNV przez krew w Europie

W dniach 25–26 stycznia 2012 roku w Salonikach miały miejsce obrady Grupy Roboczej ds. Bezpieczeństwa krwi i WNV (UE), podczas których powstał dokument: *Wirus Zachodniego Nilu i bezpieczeństwo krwi: Wprowadzenie do planu gotowości w Europie* [24]. Został on przygotowany przez ekspertów z Grecji, Włoch, Rumunii i Francji i stanowi drugą wersję dokumentu z roku 2011 [49]. Plan Gotowości zawiera m.in. wytyczne mające na celu ograniczenie przenoszenia się WNV przez krew na terenie Europy.

Rzeczywisty poziom ryzyka zakażenia WNV na danym obszarze zależy od warunków środowiska, obecności stawonogów-wektorów i patogenów, wcześniejszego przeniesienia na ludzi i sezonowego, nawracającego występowania choroby na danym obszarze.

Obszar ryzyka jest obszarem, w którym ludzie są narażeni na ryzyko (może być ono małe lub duże) zarażenia rodzimym WNV (tab. 1).

Zalecenia dotyczące ograniczenia przenoszenia się WNV przez krew są różne w zależności od kategorii obszaru ryzyka.

Zdefiniowano 4 kategorie obszarów ryzyka:

I. Obszar predyspozycji jest obszarem ryzyka, gdzie istniejące warunki mogą ułatwić przenoszenie WNV na ludzi, ale odpowiedni

czynnik chorobotwórczy nie został wykryty. Warunkami sprzyjającymi przeniesieniu są podatność i/lub wrażliwość obszaru. Podatność obszaru to obecność i/lub rozprzestrzenianie się stawonogów-wektorów oraz obecność innych czynników ekologicznych i klimatycznych sprzyjających przeniesieniu WNV u ludzi. Wrażliwość obszaru oznacza bliskość obszarów, w których aktualnie ma miejsce zakażenie WNV lub częsty napływ zakażonych osób lub grup i/lub zakażonych stawonogów.

II. Obszar zagrożony to obszar, gdzie WNV został wykryty w wektorach lub udokumentowano przeniesienie WNV na zwierzęta lub przeniesienie WNV na ludzi wystąpiło wcześniej w ciągu ostatnich 5 lat.

III. Obszar dotknięty chorobą jest obszarem, gdzie mają miejsce przeniesienia WNV na ludzi, tj. gdy zarejestrowano co najmniej jeden przypadek rodzimego zarażenia człowieka WNV, który został potwierdzony przy użyciu metod zawartych w definicji choroby. Niekiedy przypadek prawdopodobny może być wykorzystywany do określenia przeniesienia, ale tylko w szczególnych i uzgodnionych sytuacjach, kiedy potwierdzenie nie może być wykonane w najbliższym czasie.

IV. Obszar endemiczny to obszar, na którym przeniesienie WNV na ludzi trwa od 5 sezonów. Ryzyko przeniesienia WNV na ludzi na danym obszarze powinno być oceniane regularnie dla każdego sezonu transmisji przenoszenia zakażenia.

Biorąc pod uwagę powyższe kryteria, terytorium Polski należy zaliczyć do obszaru predyspozycji. Teren naszego kraju spełnia warunek podatności obszaru — występuje u nas 12 gatunków komarów zdolnych do przenoszenia wirusa, a w okresie letnim, podczas długotrwałych upałów mogą się pojawić czynniki ekologiczne i klimatyczne sprzyjające przeniesieniu WNV na ludzi. Do tej pory na obszarze RP nie wykryto odpowiedniego czynnika chorobotwórczego — wszystkie badania mające na celu wykrycie RNA wirusa u komarów i ptaków dały wynik ujemny [patrz powyżej: część pt. „Badania epidemiologiczne Wirusa Zachodniego Nilu w Polsce”]. Polska nie spełnia aktualnie kryterium wrażliwości obszaru. W strefach z nami graniczącymi nie notuje się zakażeń WNV lub częstego napływu zakażonych osób lub grup i/lub zakażonych stawonogów.

Do środków zapewnienia bezpieczeństwa krwi należą:

- odroczenie potencjalnie narażonych dawców krwi i niszczenie zakażonych donacji;

- wdrożenie laboratoryjnych metod badań przesiewowych, takich jak badanie kwasów nukleinowych (NAT);
- stosowanie metod inaktywacji czynników chorobotwórczych;
- apelowanie do dawców, aby zgłaszali wszelkie objawy chorobowe, które wystąpiły po donacji;
- czuwanie nad bezpieczeństwem krwi.

Okres czasowej dyskwalifikacji dla dawców krwi

Pobieranie krwi na obszarach niedotkniętych chorobą (obszary: **bez ryzyka, predyspozycji, zagrożony**):

- odroczenie potencjalnych dawców krwi na okres 28 dni od chwili opuszczenia obszaru dotkniętego chorobą z trwającym przeniesieniem WNV na ludzi (na podstawie Dyrektywy 2004/33/WE);
- zapewnienie placówkom służby krwi zaktualizowanych map z informacją o szerzeniu się wirusa wśród ludzi;
- osoby z rozpoznaniem zakażenia WNV mogą być przywrócone do oddawania krwi po **120 dniach** od postawienia diagnozy [74].

Pobieranie krwi w obszarach **dotkniętych chorobą i obszarach endemicznych**:

- geograficzne odroczenie dawcy — definiowanie sezonu odroczenia, we współpracy z krajowymi organami ds. zdrowia publicznego i innymi zainteresowanymi stronami, dla obywateli mieszkających na terenach dotkniętych chorobą w sezonie przenoszenia wirusa, chyba, że zostały wprowadzone badania przesiewowe WNV NAT jako środek alternatywny.

Inne środki zapobiegawcze

- Przeprowadzenie procedury spojrzenia wstecz (*look-back*) w przypadku potwierdzenia lub podejrzenia przeniesienia wirusa przez transfuzję w stosunku do próbek pobranych w okresie 120 dni przed donacją, która była reaktywna w badaniu ID-NAT (*individual donation NAT*) (Wytyczne FDA dla przemysłu 2009).
- Gorączkę, grypopodobne lub inne objawy występujące w ciągu 15 dni od donacji należy zgłaszać do punktów oddawania krwi.
- Poddawanie kwarantannie składników krwi pobieranych przed ogłoszeniem epidemii WNV. Kwarantanna składników krwi z poprzednich donacji sprzed 120 dni przed pobraniem, które były reaktywne w badaniu ID-NAT (Wytyczne FDA dla przemysłu 2009).
- Badanie retrospektywne próbek osocza.

Tabela 2. Środki dla zapewnienia bezpieczeństwa krwi w sezonie przenoszenia WNV

Table 2. Measures to ensure blood safety during the WNV season

Środki	Obszar bez ryzyka/ /Obszar predyspozycji	Obszar zagrożony	Obszar dotknięty chorobą/ /Obszar endemiczny
Odroczenie mieszkańców	Nie	Nie	Nie pobiera się krwi, chyba że wprowadzono badanie NAT
Odroczenie turystów, którzy wracają z obszarów dotkniętych chorobą	28 dni, chyba że wykonywane jest badanie NAT	28 dni, chyba że wykonywane jest badanie NAT	28 dni, chyba że wykonywane jest badanie NAT
Badania przesiewowe NAT u dawców, gdy duża ich liczba wraca z obszarów dotkniętych chorobą, w celu zapewnienia zapasów krwi	Do rozważenia, gdy jest dostępne	Do rozważenia, gdy jest dostępne	Zalecane, aby zapewnić zapasy krwi
Badania przesiewowe NAT pobranej krwi będącej w kwarantannie i retrospektywne badania NAT zapasów próbek osocza	Nie	Do rozważenia, gdy jest dostępne	Tak
Procedury inaktywacji wirusa (osocze i płytki krwi)	Nie jest konieczne	Do oceny	Do oceny
Powołanie zespołu zarządzania kryzysowego we właściwym organie	Nie, chyba, że duża liczba dawców powróciła z obszarów dotkniętych chorobą	Nie dotyczy Stosowanie procedur zespołu zarządzania kryzysowego aż obszar stanie się obszarem wolnym od wirusa	Tak, powołać
Informowanie innych państw członkowskich (właściwych organów) o rozpoczęciu badań NAT	Tak	Tak	Tak

Na podstawie: Measures to ensure blood safety during the WNV season.w Meeting Report: Expert consultation on West Nile virus infection, Thessaloniki, 25–26 January 2011 [monograph on the internet]. European Centre for Disease Prevention and Control; 2011. http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1106_MER_WNV_Expert_Consultation.pdf

- Wdrożenie procedur inaktywacji wirusów w tych składnikach krwi, dla których są one dostępne.
- **Algorytm działań na rzecz bezpieczeństwa krwi w zależności od poziomu ryzyka** (powinien być stosowany przez właściwy organ oraz placówki służby krwi). Środki dla zapewnienia bezpieczeństwa krwi w sezonie przenoszenia WNV z uwzględnieniem wszystkich 4 kategorii obszaru ryzyka zostały zawarte w tabeli 2.
- Należy wziąć pod uwagę zastosowanie dodatkowych działań w centrach krwiodawstwa:
 - udoskonalanie obowiązującego w danym kraju systemu czuwania nad bezpieczeństwem krwi;
 - dokładna kontrola protokołów pobierania i badania krwi;
 - ocena skuteczności przekazywania materiałów informacyjnych i edukacyjnych w populacji dawców;
- optymalne wykorzystanie składników krwi i właściwe gospodarowanie zapasami krwi dla zapewnienia samowystarczalności w dotkniętych chorobą obszarach, a także w potencjalnie narażonych niezarejestrowanych obszarach;
- opracowanie i monitorowanie map występowania wektora WNV (jeśli to możliwe i wskazane);
- opracowanie i monitorowanie map ludzkich przypadków zachorowań na WNV (ECDC);
- wdrożenie badań NAT w kierunku WNV oraz procedur niszczenia zakażonych donacji;
- wdrożenie środków ostrożności w celu zapewnienia bezpieczeństwa krwi i zapewnienia zapasów krwi;
- komunikacja: przekazywanie informacji właściwym organom przy użyciu szablonu sprawozdawczego o realizowanych działaniach w obszarach dotkniętych i niedotkniętych chorobą

w okresach trwającej transmisji WNV na ludzi (Dyrektywa 2005/61/WE) [24].

Podsumowanie

W ostatnich latach jesteśmy świadkami zwiększenia zasięgu występowania Wirusa Zachodniego Nilu. Biorąc pod uwagę zdrowie publiczne, w tym bezpieczeństwo przetoczeń, ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control. West Nile virus risk assessment tool. Stockholm: ECDC; 2013, Stockholm, July 2013*) w obecnej sytuacji epidemiologicznej krajów takich jak Polska zaleca prowadzenie wszechstronnej oceny sytuacji epidemiologicznej. Działania monitorujące powinny obejmować aktywności specjalistów wielu dziedzin: zarówno biologów oceniających występowanie wektorów przenoszących zakażenie na ludzi i obecność WNV u zwierząt (koni, ptaków, owadów), jak i lekarzy, którzy będą wyczuleni na zidentyfikowanie osób zakażonych. Służby epidemiologiczne powinny analizować dane dotyczące zakażeń zwierząt i ludzi nie tylko na terenie Polski, ale również na terenach sąsiednich. Wiele z elementów monitorowania już istnieje, niektóre wymagają uzupełnienia (w szczególności dostępność metod diagnostycznych, wiedza dotycząca objawów zakażenia, występowanie wektorów zdolnych do przeniesienia zakażenia w poszczególnych regionach, aktualna częstość występowania markerów zakażenia u ludzi). Dalsza współpraca interdyscyplinarna jest konieczna, aby w przyszłości ograniczyć skutki gospodarcze i zdrowotne w przypadku wystąpienia epidemii WNV na terenie Polski.

Piśmiennictwo:

1. Smithburn K.C., Hughes T.P., Burke A.W., Paul J.H. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1940; 20: 471–92.
2. Marr JS, Calisher CH. Alexander the Great and West Nile virus encephalitis. *Emerging Infectious Diseases* 2003; 9: 1599–603.
3. Stramer SL DR, Subgroup AT-TDEID. Transfusion-transmitted emerging infectious diseases: 30 years of challenges and progress. *Transfusion* 2013; 2013 Aug 9. doi: 10.1111/trf.12371. [Epub ahead of print].
4. Martin D.A., Biggerstaff B.J., Allen B., Johnson A.J., Lanciotti R.S., Roehrig J.T. Use of immunoglobulin M cross-reactions in differential diagnosis of human flaviviral encephalitis infections in the United States. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2002; 9: 544–549.
5. Knap J.P., Kubica-Biernat B. Did West Nile Fever (WNF) appear in Poland? Position of the Expect Committee appointed by the Chief Sanitary Inspector. *Przegląd epidemiologiczny* 2003; 57: 399–404.
6. Pesko K.N., Ebel G.D. West Nile virus population genetics and evolution. *Infection Genetics and Evolution* 2012; 12: 181–190.
7. Bakonyi T., Ferenczi E., Erdelyi K. i wsp. Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009. *Veterinary microbiology* 2013; 165: 61–70.
8. Bakonyi T., Ivanics T., Erdelyi K. i wsp. Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerging Infectious Diseases* 2006; 12: 618–623.
9. Bagnarelli P., Marinelli K., Trotta D. i wsp. Human case of autochthonous West Nile virus lineage 2 infection in Italy, September 2011. *Eurosurveillance* 2011; 16: 5–8.
10. Magurano F., Remoli M.E., Baggieri M. i wsp. Circulation of West Nile virus lineage 1 and 2 during an outbreak in Italy. *Clinical Microbiology and Infection* 2012; 18: E545–E7.
11. Papa A., Politis C., Tsoukala A. i wsp. West Nile Virus Lineage 2 from Blood Donor, Greece. *Emerging Infectious Diseases* 2012; 18: 688–689.
12. Kondrusik M., Ferenczi E., Zajkowska J. i wsp. The evaluation of serum presence of antibodies reacting with West Nile Fever virus (WNV) antigens among inhabitants from Podlaskie and Świętokrzyskie region. *Przegląd epidemiologiczny* 2007; 61.
13. Samorek-Salamonowicz E. Wirus Zachodniego Nilu — zagrożenie dla zdrowia publicznego. W: Niczypruk J.S. (red.). *Medycyna Weterynaryjna* 2008: 1368–1370.
14. Kilpatrick A.M., LaDeau S.L., Marra P.P. Ecology of West Nile virus transmission and its impact on birds in the western hemisphere. *Auk* 2007; 124: 1121–1136.
15. Samorek-Salamonowicz E., Niczypruk J.S. West Nile virus other emerging threats to public health. *Postępy Mikrobiologii* 2010; 49: 187–190.
16. Strauss J.H., Strauss E.G. *Viruses and Human Disease*, wyd. 2, Academic Press 2007; 3: 118.
17. Arjona A., Wang P., Montgomery R.R., Fikrig E. Innate immune control of West Nile virus infection. *Cellular Microbiology* 2011; 13: 1648–1658.
18. Konrad S.K., Miller S.N. Application of a degree-day model of West Nile virus transmission risk to the East Coast of the United States of America. *Geospatial Health* 2012; 7: 15–20.
19. *West Nile Fever [monograph on the internet]*. EPI-NEWS, NATIONAL SURVEILLANCE OF COMMUNICABLE DISEASES: Statens Serum Institut; 2003. Available from: <http://www.ssi.dk/English/News/EPI-NEWS/-/media/Indhold/EN%20-%20engelsk/EPI-NEWS/2003/pdf/EPI-NEWS%20-%202003%20-%20No%204.ashx>.
20. Kilpatrick A.M., Meola M.A., Moudy R.M., Kramer L.D. Temperature, viral genetics, and the transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* mosquitoes. *Plos. Pathogens*. 2008; 4: e1000092.
21. West Nile Virus MONITOR Surveillance Maps-Clinical Cases and Asymptomatic Infections Canada, October 27, 2012, Public Health Agency of Canada, <http://www.phac-aspc.gc.ca/wnv-vwn/map-carte/map-carte-surv2012-eng.php>.
22. Daily Data Report for June, July, August, September 2012 — Toronto, National Climate Data and Information Archive, www.climate.weatheroffice.gc.ca *Geospatial Health* 2012; 7 (1): 15–20.
23. Hermanowska-Szpakowicz T., Grygorczuk S., Kondrusik M., Zajkowska J., Pancewicz S. Infections caused by West Nile virus. *Przegląd epidemiologiczny* 2006; 60: 93–98.
24. West Nile Virus and Blood Safety Introduction to a Preparedness Plan in Europe. In: Prepared by: Greece I, Romania and France, ed. West Nile Virus and Blood Safety Introduction to a Preparedness Plan in Europe. Based on the EU Satellite Meeting of the Working Group on Blood Safety and WNV, Thessaloniki, 25–26 January 2012, 2012.

25. Debiasi R.L. West Nile virus neuroinvasive disease. *Current infectious disease reports* 2011; 13: 350–359.
26. West Nile virus, Fact sheet N°354 [monograph on the internet]. WHO Media centre; 2011. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs354/en/index.html>
27. Carson P.J., Konewko P., Wold K.S., Mariani P., Goli S., Bergloff P., Crosby R.D. Long-term clinical and neuropsychological outcomes of West Nile virus infection. *Clinical Infectious Diseases* 2006; 43: 723–730.
28. Sejvar J.J. The long-term outcomes of human West Nile virus infection. *Clinical Infectious Diseases* 2007; 44: 1617–1624.
29. Murray K., Walker C., Herrington E. i wsp. Persistent Infection with West Nile Virus Years after Initial Infection. *Journal of Infectious Diseases* 2010; 201: 2–4.
30. Tobler L.H., Cameron M.J., Lanteri M.C. Interferon and interferon-induced chemokine expression is associated with control of acute viremia in West Nile virus-infected blood donors. *Journal of Infectious Diseases* 2008;198: 1575.
31. Lanteri M.C., Kaidarova Z., Bravo M.D. i wsp. Association between ABO and D/Rhesus blood groups and WNV disease outcome in blood donors: Blood group A and D/Rhesus — negativity as new risk factors for symptomatic infection. *Vox Sang.* 2013; 105: 57.
32. Lanteri M.C., Diamond M.S., Norris P.J., Busch M.P. West Nile virus. II. Immunopathophysiology in humans. *M S-Medecine Sciences* 2011; 27: 382–386.
33. Lanteri M.C., Assal A., Norris P.J., Busch M.P. West Nile virus. I. Conquest of the West. *M S-Medecine Sciences* 2011; 27: 375–381.
34. Lanteri M.C., O'Brien K.M., Purtha W.E. i wsp. Tregs control the development of symptomatic West Nile virus infection in humans and mice. *Journal of Clinical Investigation* 2009; 119: 3266–3277.
35. Rios M., Daniel S., Dayton A.I. i wsp. In vitro evaluation of the protective role of human antibodies to West Nile virus (WNV) produced during natural WNV infection. *Journal of Infectious Diseases* 2008; 198: 1300–1308.
36. Rios M., Daniel S., Chancey C., Hewlett I.K., Stramer S.L. West Nile virus adheres to human red blood cells in whole blood. *Clinical Infectious Diseases* 2007; 45: 181–186.
37. Rios M., Zhang M.J., Grinev A. i wsp. Monocytes-macrophages are a potential target in human infection with West Nile virus through blood transfusion. *Transfusion* 2006; 46: 659–667.
38. Hubalek Z., Halouzka J. West Nile fever — a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerging Infectious Diseases* 1999; 5: 643–650.
39. Mission Report: West Nile virus infection outbreak in humans in Romania [monograph on the internet]. ECDC, WHO Europe; 2010. Available from: http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1104_MIR_West_Nile_outbreak_Romania.pdf
40. LaDeau S.L., Kilpatrick A.M., Marra P.P. West Nile virus emergence and large-scale declines of North American bird populations. *Nature* 2007; 447: 710–U13.
41. Artsob H., Gubler D.J., Enria D.A. i wsp. West Nile Virus in the New World: Trends in the Spread and Proliferation of West Nile Virus in the Western Hemisphere. *Zoonoses and Public Health* 2009; 56: 357–369.
42. West Nile Virus Activity in the United States 2003 [monograph on the internet]. Centers for Disease Control and Prevention; 2003. Available from: http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/surv&controlCaseCount03_detailed.htm
43. Meeting Report: Expert consultation on West Nile virus infection, Thessaloniki, 25–26 January 2011 [monograph on the internet]. European Centre for Disease Prevention and Control; 2011. Available from: http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1106_MER_WNV_Expert_Consultation.pdf
44. West Nile fever maps [monograph on the internet]. European Centre for Disease Prevention and Control; 2012. Available from: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west_nile_fever/West-Nile-fever-maps/Pages/index.aspx
45. Calistri P., Giovannini A., Hubalek Z. i wsp. Epidemiology of West Nile Virus in Europe and in the Mediterranean Basin. *The Open Virology Journal* 2010; 4: 29–37.
46. Hubalek Z., Wegner E., Halouzka J. i wsp. Serologic survey of potential vertebrate hosts for West Nile Virus in Poland. *Viral Immunology* 2008; 21: 247–254.
47. Kubica-Biernat B., Kruminis-Łozowska W., Stańczak J., Cieniuch S. A study on the occurrence of West Nile virus in mosquitoes (Diptera: Culicidae) on the selected areas in Poland. *Wiadomości Parazytologiczne* 2009; 55: 259–263.
48. Niczyporuk J.S., Samorek-Salamonowicz E., Kozdrun W., Mizak Z. The survey of wild birds for West Nile virus in Poland. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 2011; 14: 573–577.
49. West Nile Virus and Blood Safety Introduction to a Preparedness Plan in Europe. In: *West Nile Virus and Blood Safety Introduction to a Preparedness Plan in Europe. Based on the EU Satellite Meeting of the Working Group on Blood Safety and WNV T*, 27 January 2011, ed., 2011.
50. USTAWA z dnia 5 grudnia 2008 r. o zapobieganiu oraz zwalczaniu zakażeń i chorób zakaźnych u ludzi. *Dz. U.* z 2008 r. Nr 234, poz. 1570, z 2009 r. Nr 76, poz. 641, z 2010 r. Nr 107, poz. 679, Nr 257, poz. 1723, z 2012 r. poz. 892, 2008.
51. Pealer L.N., Marfin A.A., Petersen L.R. i wsp. Investig WNV. Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. *New England Journal of Medicine* 2003; 349: 1236–1245.
52. Tobler L.H., Bianco C., Glynn S.A. i wsp. Detection of West Nile virus RNA and antibody in frozen plasma components from a voluntary market withdrawal during the 2002 peak epidemic. *Transfusion* 2005; 45: 480–486.
53. de Oliveira A.M., Beecham B.D., Montgomery S.P. i wsp. West Nile virus blood transfusion-related infection despite nucleic acid testing. *Transfusion* 2004; 44: 1695–1699.
54. Lai L., Lee T.-H., Tobler L. i wsp. Relative distribution of West Nile virus RNA in blood compartments: implications for blood donor nucleic acid amplification technology screening. *Transfusion* 2012; 52: 447–454.
55. Tardei G., Ruta S., Chitu V., Rossi C., Tsai T.F., Cernescu C. Evaluation of immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme immunoassays in serologic diagnosis of West Nile virus infection. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38: 2232–2239.
56. Petersen L.R., Marfin A.A. West Nile virus: A primer for the clinician. *Annals of Internal Medicine* 2002; 137: 173–179.
57. Weiss D., Carr D., Kellachan J. i wsp. Clinical findings of West Nile virus infection in hospitalized patients, New York and New Jersey, 2000. *Emerging Infectious Diseases* 2001; 7: 654–658.
58. Zou S., Foster G.A., Dodd R.Y., Petersen L.R., Stramer S.L. West Nile Fever Characteristics among Viremic Persons Identified through Blood Donor Screening. *Journal of Infectious Diseases* 2010; 202: 1354–1361.
59. O'Brien S.F., Scalia V., Zuber E. i wsp. West Nile virus in 2006 and 2007: the Canadian Blood Services' experience. *Transfusion* 2010; 50: 1118–1125.

60. Goodrich R.P., Custer B., Keil S., Busch M. Defining "adequate" pathogen reduction performance for transfused blood components. *Transfusion* 2010; 50: 1827–1837.
61. Jakubik J.J., Vicik S.M., Tannatt M.M., Kelley B.D. West Nile Virus inactivation by the solvent/detergent steps of the second and third generation manufacturing processes for B-domain deleted recombinant factor VIII. *Haemophilia* 2004; 10: 69–74.
62. Kreil T.R., Berting A., Kistner O., Kindermann J. West Nile virus and the safety of plasma derivatives: verification of high safety margins, and the validity of predictions based on model virus data. *Transfusion* 2003; 43: 1023–1028.
63. Mohr H., Knuver-Hopf J., Gravemann U., Redecker-Klein A., Muller T.H. West Nile virus in plasma is highly sensitive to methylene blue-light treatment. *Transfusion* 2004; 44: 886–890.
64. Williamson L.M., Cardigan R., Prowse C.V. Methylene blue-treated fresh-frozen plasma: what is its contribution to blood safety? *Transfusion* 2003; 43: 1322–1329.
65. Gallian P., Vignoli C., Dombey A.M. i wsp. Inactivation of a European strain of West Nile virus in single-donor platelet concentrate using the INTERCEPT blood system. *Vox Sang.* 2006; 91: 345–347.
66. Lin L.L., Hanson C.V., Alter H.J. i wsp. Inactivation of viruses in platelet concentrates by photochemical treatment with amotosalen and long-wavelength ultraviolet light. *Transfusion* 2005; 45: 580–590.
67. Ruane P.H., Edrich R., Gampp D., Keil S.D., Leonard R.L., Goodrich R.P. Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light. *Transfusion* 2004; 44: 877–885.
68. Monath T.P., Arroyo J., Miller C., Guirakhoo F. West Nile virus vaccine. *Current drug targets. Infectious disorders* 2001; 1: 37–50.
69. Tesh R.B., Arroyo J., da Rosa A., Guzman H., Xiao S.Y., Monath T.P. Efficacy of killed virus vaccine, live attenuated chimeric virus vaccine, and passive immunization for prevention of West Nile virus encephalitis in hamster model. *Emerging Infectious Diseases* 2002; 8: 1392–1397.
70. Arroyo J., Miller C., Catalan J. i wsp. Chimeri Vax-West Nile virus live-attenuated vaccine: Preclinical evaluation of safety, immunogenicity, and efficacy. *Journal of Virology* 2004; 78: 12497–12507.
71. Dayan G.H., Bevilacqua J., Coleman D., Buldo A., Risi G. Phase II, dose ranging study of the safety and immunogenicity of single dose West Nile vaccine in healthy adults \geq 50 years of age. *Vaccine* 2012; 30: 6656–6664.
72. Iwamoto M., Jernigan D.B., Guasch A. i wsp. West Nile Virus Transplant R. Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients. *New England Journal of Medicine* 2003; 348: 2196–2203.
73. Capobianchi M.R., Sambri V., Castilletti C. i wsp. Italian Transplant N. Retrospective screening of solid organ donors in Italy, 2009, reveals unpredicted circulation of West Nile virus. *Euro-surveillance* 2010; 15.
74. Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components. European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care of the Council of Europe (EDQM), 2011.