

Metody identyfikacji zakażeń wirusem nabytego deficytu odporności (HIV) u dawców krwi w Polsce w latach 2005–2022

Ewa Sulkowska, Piotr Grabarczyk 

Zakład Wirusologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Sulkowska E, Grabarczyk P. Methods of identification of human immunodeficiency virus (HIV) infections in Polish blood donors (2005–2022). J Transf Med 2023; 16 (4): 211–227. DOI: 10.5603/jtm.99301

Należy cytować wersję pierwotną.

Streszczenie

Wirus HIV stanowi wciąż istotny problem dla zdrowia publicznego w Polsce i na świecie — szacowana liczba zakażonych na całym świecie od początku epidemii AIDS/HIV przekroczyła 84 miliony osób, a z powodu AIDS zmarło około 40 mln osób.

Jedną z dróg przeniesienia zakażenia HIV jest transfuzja krwi i jej składników. Ryzyko przeniesienia zakażenia tą drogą zostało istotnie zredukowane między innymi przez wprowadzenie obowiązkowych badań przeglądowych u dawców krwi. Jednak nadal są odnotowywane sporadyczne przypadki przeniesienia zakażenia przez transfuzję związane z tak zwanym okienkiem diagnostycznym oraz polimorfizmem wirusa.

W Polsce u wszystkich dawców krwi w 1987 roku wprowadzono obowiązkowe badanie przeciwciał anti-HIV, a w 2005 roku RNA HIV. Badania technikami immunoenzymatycznymi były sukcesywnie doskonalone i obecnie wszystkie Centra Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (CKiK) w Polsce badają u dawców zarówno przeciwciała klasy IgG, jak i IgM oraz antygen p24 (testy IV generacji). RNA HIV bada się w pojedynczych donacjach (IDT) lub w mini pulach (MP); czułość wykrywania wyrażona jako 95% limit detekcji [95% LOD] wynosi odpowiednio 45 do 18 j.m./ml i 1469 j.m./ml do 302 j.m./ml.

Badania weryfikacyjne są wykonywane wyłącznie w Zakładzie Wirusologii IHiT za pomocą testów typu Western blot (WB) oraz metod biologii molekularnej: metodą amplifikacji przez transkrypcję (TMA) oraz metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR).

W niniejszej publikacji szczegółowo przedstawiono strategię oraz metodykę prowadzenia badań przeglądowych oraz weryfikacyjnych w kierunku HIV u dawców krwi w Polsce w latach 2005–2022. Opracowanie stanowi rozwinięcie oraz aktualizację części rozprawy doktorskiej autorki oraz inicjuje dyskusję dotyczącą procesu kwalifikacji dawców oraz efektywności badań przeglądowych.

Słowa kluczowe: RNA HIV; anti-HIV; antygen p24; dawca krwi; badania przeglądowe; NAT; WB HIV

J. Transf. Med. 2023; 16: 228–245

Adres do korespondencji: dr n. med. Ewa Sulkowska, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Zakład Wirusologii, ul. Indry Gandhi 14, 02–776 Warszawa, e-mail: esulkowska@ihit.waw.pl

Nadesłano: 03.10.2023

Przyjęto do druku: 03.11.2023

Data pierwszej publikacji: 31.12.2023

Artykuł jest dostępny bezpłatnie na podstawie licencji Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) umożliwiającej jego pobranie oraz udostępnianie pod warunkiem wskazania autorstwa i wydawcy. Niedopuszczalne jest wprowadzanie jakichkolwiek zmian lub wykorzystanie komercyjne bez zgody wydawcy.

Wstęp

Po ponad 30 latach od odkrycia ludzkiego wirusa niedoboru odporności (HIV, *human immunodeficiency virus*) sytuacja epidemiologiczna w zakresie zakażeń tym wirusem na świecie stanowi wciąż istotne wyzwanie dla zdrowia publicznego. Od początku epidemii zespołu nabytego niedoboru odporności (AIDS, *acquired immunodeficiency syndrome*) zakażenie HIV zdiagnozowano u około 85 milionów osób. Z powodu AIDS zmarło około 40 mln osób [1]. W Polsce od początku epidemii (1985 r.) zakażenie wykryto u około 28 tys. osób, AIDS rozpoznano u blisko 4 tys. osób, a 1448 chorych zmarło [2].

Obecnie przetaczanie krwi i jej składników jest bezpieczne. Procedury ograniczające ryzyko przeniesienia biologicznych czynników chorobotwórczych, w tym HIV, są wprowadzane w polskim krwiodawstwie sukcesywnie w ogłaszanych dokumentach i aktach prawnych [3–8] zgodnie z wytycznymi zawartymi w dyrektywach Unii Europejskiej [9–12] oraz zaleceniami Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) [13]. Testy i aparatura poszczególnych producentów posiadają świadectwa dopuszczenia do badań wydane przez Agencję Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*) [14]. Nadal na świecie zdarzają się sporadyczne przypadki przeniesienia zakażenia HIV przez transfuzję, mimo wprowadzenia procedur zapewniających bezpieczeństwo krwi i jej składników [15–19].

Odkrycie HIV a bezpieczeństwo przetoczeń oraz rozpoczęcie badań w krwiodawstwie

Zespół nabytego niedoboru odporności po raz pierwszy został rozpoznany latem 1981 roku w Stanach Zjednoczonych. Młodzi, homoseksualni mężczyźni zapadali na oportunistyczne infekcje powodujące ciężkie zapalenie płuc wywołane przez bakterię *Pneumocystis carinii*. Chorzy byli wycieńczeni, mieli zmiany na twarzy wywołane rzadkim nowotworem, zwanym mięsakiem Kaposiego. Charakterystyczną cechą tej choroby była limfopenia i znaczne obniżenie liczby limfocytów CD4+ [20]. Obserwacje i dane epidemiologiczne z 1982 roku pokazały, że nowo opisany zespół chorobowy rozprzestrzenił się również w innych grupach, między innymi wśród chorych na hemofilię, narkomanów i wykazuje cechy choroby zakaźnej; jest przenoszony przez płyny ustrojowe, zakażoną krew lub produkty krwipochodne [21–26]. *Centre for Disease*

Prevention and Control (CDC) we wrześniu 1982 roku dla opisanej powyżej choroby zaproponowało nazwę AIDS [20]. Na początku 1983 roku AIDS po raz pierwszy odnotowano wśród kobiet będących partnerkami mężczyzn, którzy chorowali na tę chorobę [24]. Jednocześnie pojawiły się doniesienia na temat AIDS u dzieci, które jak podejrzewano, zaraziły się od swoich matek w trakcie ciąży lub w trakcie porodu lub wkrótce po urodzeniu [27, 28].

W marcu 1983 roku w Stanach Zjednoczonych wydano zalecenia dotyczące zapobiegania AIDS. Wprowadzono rekomendacje, aby osoby należące do grup o zwiększonym ryzyku zachorowania na AIDS powstrzymywały się od oddawania krwi i jej składników do celów leczniczych. Zalecenie to miało na celu zmniejszenie ryzyka AIDS związanego z podawaniem krwi lub produktów krwipochodnych. Przypadki AIDS w następstwie przetoczenia krwi stanowiły wówczas około 2% wszystkich zgłoszonych przypadków AIDS w Stanach Zjednoczonych [29]. Szacuje się, że na początku epidemii w Stanach Zjednoczonych nawet 1 na 100 donacji mogła przenosić zakażenie HIV lub HCV [30]. Wydanie rekomendacji nie wpłynęło istotnie na zmianę procedur służących zachowaniu bezpieczeństwa krwi i jej składników w Stanach Zjednoczonych, ponieważ kwestionowano proponowane strategie kwalifikacji dawców jako nieskuteczne lub dyskryminujące środowiska homoseksualnych mężczyzn [31].

Dalsze prace nad ustaleniem przyczyny zachorowań na AIDS doprowadziły w maju 1983 roku do wyizolowania w Instytucie Pasteura w Paryżu nowego wirusa, któremu nadano nazwę LAV (ang. *lymphadenopathy-associated virus*), później LAV_{BRO} (indeks BRO pochodził od pierwszych liter nazwiska pacjenta). Postawiono hipotezę, że to właśnie ten wirus jest przyczyną AIDS [32]. Nowo poznany retrowirus posiadał wiele cech wcześniej odkrytych wirusów ludzkiej białaczki T-komórkowej (HTLV, *human T-lymphotropic virus*). Wirus został wyizolowany z materiału pobranego od pacjenta rasy kaukaskiej, chorego na AIDS, a jego materiał genetyczny miał postać RNA. Ostatecznie nowo poznanego wirusa zakwalifikowano do rodziny retrowirusów T-limfotropowych [32].

Kolejnym krokiem w kierunku poznania czynnika wywołującego AIDS było odkrycie dokonane przez amerykańskich uczonych z *National Cancer Institute* w Bethesda. W kwietniu 1984 roku instytut ten ogłosił, że zidentyfikowano przyczynę AIDS — retrowirusa HTLV-III. Podczas wspólnej konferencji z Instytutem Pasteura ogłoszono, że LAV i HTLV-III są identyczne i są prawdopodob-

ną przyczyną AIDS [33]. Na tym etapie wiedzy o wirusie zakładano, że szczepionka zostanie opracowana w ciągu 2 lat [34]. Nazwę HIV nadano nowo odkrytemu wirusowi w 1986 roku [35]. Powstały liczne kontrowersje dotyczące ustalenia, kto pierwszy wyizolował wirusa HIV. Wydaje się, że spór ten został rozstrzygnięty przez przyznanie Nagrody Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii w 2008 roku profesorom Françoise Barré-Sinoussi i Lucowi Montagnier za odkrycie HIV [36].

Na początku 1985 roku FDA zarejestrowało pierwszy test immunoenzymatyczny (ELISA, *enzyme linked immunosorbent assay*), służący identyfikacji przeciwciał anti-HTLV III/LAV [37]. W tym samym roku wydano rekomendację badania przesiewowego dawców krwi i jej składników w kierunku anti-HTLV III. Zgodnie z tymi zaleceniami wszystkie donacje z pozytywnymi wynikami testu przeglądowego miały być niszczone, a dawca był powiadamiany o wynikach badań. Za wynik pozytywny uznawano wynik powtarzalnie reaktywny. Każde badanie, którego wynik był wstępnie reaktywny, miało być powtarzane. W tym celu stosowano inne dostępne testy, najczęściej testy immunofluorescencyjne i radioimmunoprecypitacyjne. W kolejnych latach zaczęto wykonywać badania potwierdzające z zastosowaniem testów typu *Western blot* (WB) — pierwszy test WB FDA zarejestrowała 29 kwietnia 1987 roku [38, 39], w którym ustalano obecność swoistych przeciwciał do poszczególnych białek HIV.

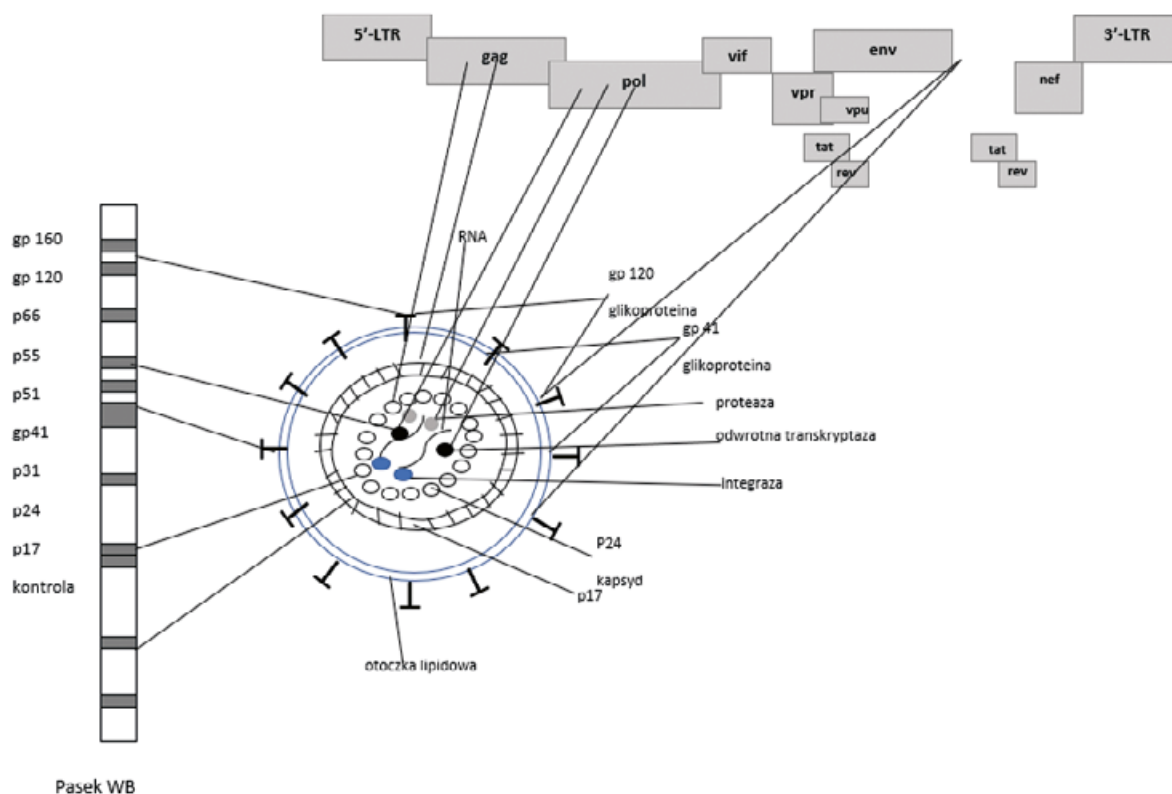
Budowa, organizacja genomu, taksonomia

Wirus HIV należy do rodziny *Retroviridae*, rodzaj *Lentiviridae*. Dotychczas wydzielono dwa typy wirusa: HIV-1 i HIV-2 [40]. Wirion ma kulisty kształt o średnicy około 100 nm, składa się z rdzenia w kształcie cylindra oraz lipidowej osłonki (ryc. 1). Każdy wirion zawiera 72 kompleksy glikoproteinowe, które są zintegrowane z błoną lipidową, a każdy kompleks składa się z trimerów zewnętrznej glikoproteiny gp120 i transbłonowego białka spinającego gp41. Wiązanie między gp120 a gp41 jest luźne, łatwo dochodzi do jego zerwania. Glikoproteinę gp120 można wykryć zarówno w surowicy, jak i w tkance limfatycznej pacjentów zakażonych wirusem HIV. Pod osłonką znajduje się warstwa białka (p17). W kapsydzie zbudowanym z białka p24 znajduje się materiał genetyczny mający postać dwóch pojedynczych kopii ssRNA(+). W wirionie znajdują się białka p6 i p7, dwie cząsteczki transportowego RNA (tRNA) będące starterami

do syntezy cDNA, enzymy wirusowe — odwrotna transkryptaza (heterodimer składający się z białka p66 posiadającego domenę o aktywności polimeraz i RNAzy H oraz białka p51 o działaniu stabilizującym), proteaza p10 i integraza p32 (ryc. 1). Genom wirusa HIV-1 obejmuje 9 genów. Trzy z nich — *gag*, *pol*, *env* — kodują informacje potrzebne do wytworzenia białek strukturalnych i enzymatycznych, pozostałe, to jest: *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu*, niosą informacje o budowie białka regulatorowego, kontrolującego zdolność HIV-1 do zakażenia komórek, produkcji wirionów potomnych i progresji choroby. Na obu końcach genomu znajdują się sekwencje LTR (*long terminal repeat*, długie powtórzone sekwencje nukleotydów). Są to regiony odpowiedzialne za regulację ekspresji genów wirusa [40, 41]. Organizacja budowy wirusa jest istotna dla zrozumienia konstrukcji oraz efektywności testów wykorzystywanych do identyfikacji zakażonych dawców. W testach typu WB są wykorzystywane główne białka strukturalne HIV (ryc. 1). Jak powiedziano wcześniej, testy WB są wykonywane w celu potwierdzenia swoistości przeciwciał wykrytych w badaniach diagnostycznych oraz przeglądowych u dawców krwi. W polskim krwiodawstwie interpretowano wynik WB HIV zgodnie z wytycznymi Amerykańskiego Czerwonego Krzyża, gdzie za wynik dodatni uważa się wynik, w którym stwierdza się obecność przeciwciał przynajmniej do jednego białka wirusa w każdej z trzech kategorii białek — białek tworzących otoczkę, rdzeń i białek enzymatycznych. Obecnie, gdy testy do badań wirusa HIV muszą być certyfikowane (CE IVD wraz z numerem jednostki notyfikującej) [42, 43], stosuje się interpretację wyników zgodnie z ulotką producenta. Wynik ujemny to wynik, w którym nie wykryto przeciwciał do żadnego z białek. Wynik nieokreślony to wynik, który nie spełnia kryterium wyniku dodatniego ani ujemnego. Najczęściej jest spowodowany nieswoistymi reakcjami lub może wskazywać na wczesną fazę zakażenia [44–46]. Zastosowanie poszczególnych białek wirusa do skonstruowania testu przedstawiono na rycinie 1.

Ewolucja metodyki badań diagnostycznych i przeglądowych

Testy immunoenzymatyczne (EIA, *enzyme immunoassay* lub ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*) są oparte na wiązaniu przeciwciał z surowicy pacjenta przez antygeny związane kowalencyjnie z fazą stałą (dno studzienki). Powstały kompleks antygen–przeciwciało po odpłukaniu niezwiązanych przeciwciał jest inkubowany z substra-



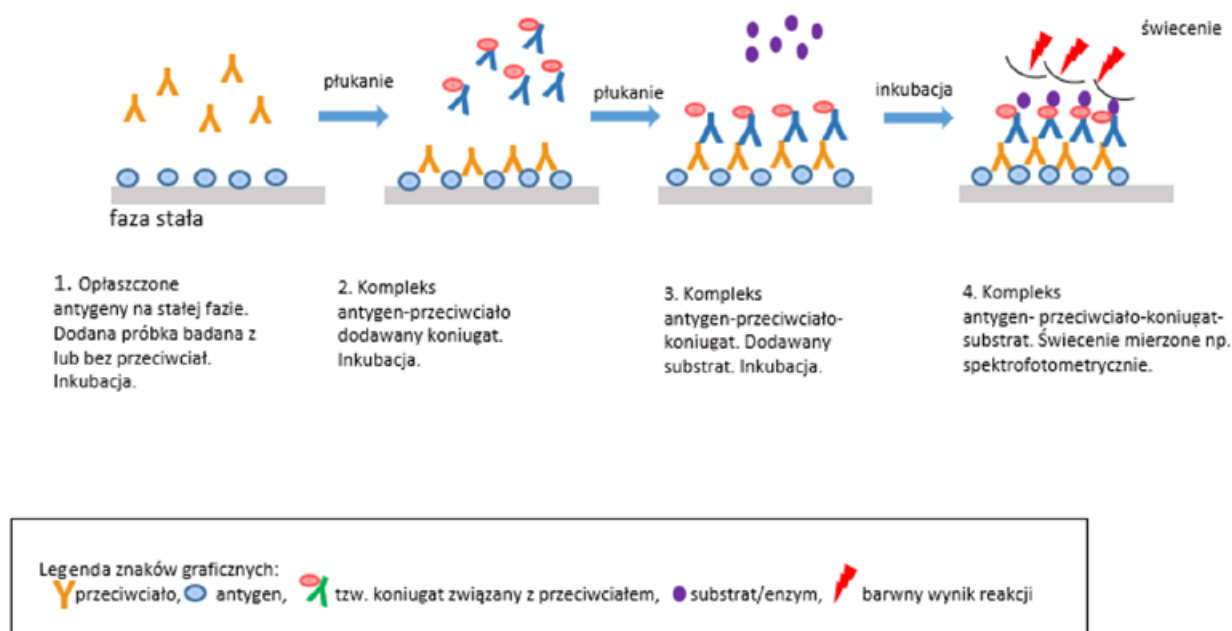
Rycina 1. Organizacja wirionu HIV a konstrukcja testu typu *Western blot*. Opracowano na podstawie [40]

tem. W przypadku obecności przeciwciał powstaje barwny kompleks, a produkt reakcji jest mierzony spektrofotometrycznie. Schemat obrazujący podstawowe zasady działania testu EIA I-III generacji przedstawiono na rycinie 2. W przypadku testów IV i V generacji oprócz antygenów na fazie stałej są opłaszczane swoiste przeciwciała anti-p24. W trakcie badania do dołka opłaszczanego antygenem (faza stała) jest dodawana próbka badana, w której są poszukiwane przeciwciała skierowane do białek wirusa. Jeśli obecne są w niej przeciwciała skierowane do tego antygeny, powstaje kompleks immunologiczny i przeciwciało zostaje trwale związane z podłożem. Następnym etapem badania jest odplukanie nieswoistych przeciwciał obecnych w badanej surowicy/osoczu. Po odplukaniu dołka jest dodawany tak zwany koniugat, czyli przeciwciało (skierowane przeciw przeciwciałom ludzkim) połączone wiązaniem kowalencyjnym z enzymem. Po inkubacji i ponownym przepłukaniu dołka jest dodawany odpowiedni dla użytego enzymu substrat. W wyniku reakcji enzymatycznej powstaje produkt reakcji (najczęściej barwny), którego obecność ocenia się odpowiednimi metodami (najczęściej metodą spektrofotometryczną, chociaż

często w testach EIA są stosowane także metody chemiluminometrii). Wiele komercyjnych testów EIA ma bardziej skomplikowaną konstrukcję od podanej powyżej; najnowsze ich generacje pozwalają wykryć nie tylko przeciwciała anti-HIV, ale też antygeny wirusa.

Warto podkreślić, że wartość sygnału świetlnego jest najczęściej proporcjonalna do ilości przeciwciał w badanym materiale. Dzięki swoistości wiązania antygen–przeciwciało wyniki uzyskiwane za pomocą testów EIA mają wysoką wiarygodność. Jednak sporadycznie zdarzają się przypadki, gdy jest otrzymywany wynik nieswoisty, będący następstwem reakcji krzyżowej, gdy przeciwciało wiąże się z innym antygenem [47, 48]. Dlatego ważne jest, aby w przypadku badań w kierunku wirusa HIV każdorazowo weryfikować reaktywny wynik ELISA w teście potwierdzenia [47, 49].

Do konstrukcji testów I generacji wykorzystywano jako źródło antygeny lizat z zakażonych komórek, a do wizualizacji używano monoklonalne przeciwciała zwierzęce wykrywające ludzkie przeciwciała klasy IgG [49, 50]. Firmą, która jako pierwsza otrzymała rejestrację, była Abbott Laboratories [51]. W kolejnych latach ulepszano test



Rycina 2. Schemat obrazujący podstawowe zasady działania testu ELISA/EIA generacji I-III. Opracowano na podstawie [48]. Koniugat — kompleks enzymu z przeciwciałami

ELISA. W testach II generacji wykorzystywano glikoproteiny lub rekombinowane antygeny, zamiast całych białek. Zmiana ta umożliwiła zwiększenie swoistości i czułości testów [50]. W testach III generacji zastosowano odmienną konstrukcję testu EIA. Rekombinowane antygeny HIV umieszczone w fazie stałej, tak jak w testach poprzedniej generacji, wykorzystano do „wyłapania” z surowicy przeciwciał anti-HIV obu klas IgG i IgM. Związane przeciwciała wykrywano za pomocą przeciwciał skierowanych do powstałych kompleksów lub innych fragmentów syntetycznych/rekombinowanych antygenów HIV wyznakowanych enzymatycznie (tzw. *antigen sandwich*). Przeciwciała lub antygen są kowalencyjnie oznakowane enzymem lub biotyną/streptawidyną, tworząc tak zwany koniugat (ryc. 2). Taka konstrukcja testu doprowadziła do dalszego zwiększenia swoistości testu oraz umożliwiła wykrywanie, oprócz przeciwciał klasy IgG, także izotypu IgM. Nowe testy pozwalały na wykrycie przeciwciał około 21 dni od zakażenia, tym samym został skrócony czas okienka serologicznego.

Testy IV generacji (tzw. combo) wykrywają zarówno antygen p24 (HIV-1), jak i przeciwciała skierowane do HIV-1 i HIV-2. Antygen p24 HIV jest białkiem tworzącym większość rdzenia wirusa. Stężenie antygeny p24 w surowicy krwi w pierw-

szych kilku tygodniach po zakażeniu jest wysokie, dlatego badanie tego markera jest szczególnie przydatne do diagnozowania infekcji HIV na wczesnym etapie, gdy poziom przeciwciał jest niski [52]. Test IV generacji został opracowany w 1989 roku przez zespół naukowy firmy Abbott. Jego stosowanie pozwala skrócić okienko serologiczne średnio o 7 dni w porównaniu z testami III generacji (do 14 dni) [50, 53–56]. W 2015 roku wprowadzono do diagnostyki HIV testy V generacji, wykrywające jednocześnie obie klasy przeciwciał (IgG i IgM) oraz antygen p24. Podstawową różnicą, w porównaniu z testami IV generacji, jest dodatkowa możliwość uzyskania oddzielnych wyników dla przeciwciał oraz antygeny p24 [50].

Do weryfikacji wyników reaktywnych w testach EIA są wykorzystywane testy typu *Western blot* (WB). Badanie ma charakter testu immunoenzymatycznego i wynik widoczny jest w postaci prążków odpowiadających poszczególnym białkom (ryc. 1). Odczyt reakcji może być wizualny, bez użycia aparatury lub zautomatyzowany, przy użyciu czytnika. W przypadku testów WB można określić, do którego białka zostały wytworzone przeciwciała. Testy te charakteryzują się wyższą swoistością niż testy ELISA [57–59].

Algorytm badań przeglądowych oraz weryfikacyjnych wykonywanych u dawców krwi przedsta-

HIV-1

1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Niemcy		Austria Japonia Stany Zjednoczone	Austria Holandia Singapur	Kanada Francja Nowa Zelandia Hiszpania	Belgia, Hong Kong, Irlandia Szwajcaria	Grecja Polska Portugalia Wielka Brytania		RPA, Korea Południowa	Estonia Włochy Tajlandia	Kuwejt Malezja Słowenia	Finlandia Izrael Łotwa Tajwan	Dania, Norwegia	

Rycina 3. Harmonogram wprowadzania badań NAT w badaniu kwalifikacyjnym dawców krwi w poszczególnych krajach przed 2010 rokiem. Opracowano na podstawie [71]

wiono w wytycznych europejskich [60], a u innych osób wykonujących badanie w kierunku wirusa HIV w wytycznych krajowych [61–67]. W pionie krwiodawstwa próbka wstępnie reaktywna jest ponownie badana w dwóch powtórzeniach. Po uzyskaniu wyniku powtarzalnie reaktywnego przeprowadza się badanie weryfikacyjne za pomocą technik serologicznych i badań technikami NAT (metody biologii molekularnej, *nucleic acid testing* [3–8].

Badania nad wirusem odpowiedzialnym za AIDS technikami biologii molekularnej rozpoczęto w drugiej połowie lat 80. XX wieku w Stanach Zjednoczonych [68]. Dzięki poznaniu sekwencji genomu wirusa stały się możliwe jego badania u krwiodawców. Analizując zasadność prowadzenia badań RNA HIV u krwiodawców, podkreślano jednak, mimo że powalają one wykryć zakażenie przed pojawieniem się antygenu p24 oraz przeciwciał anti-HIV, że efektywność ich stosowania jest niewielka ze względu na niską częstość oczekiwanych wyników dodatnich. Za pomocą modeli matematycznych obliczono, że badania RNA HIV zapobiegnie w Stanach Zjednoczonych 16 przypadkom przeniesienia wirusa na rok, a koszt takich badań wyniesie 96 milionów dolarów rocznie [69]. Wskazywano na duże trudności techniczne związane z wykonaniem testów NAT oraz ich niską opłacalność (*cost effectiveness*). W kolejnych latach wykazano, że wprowadzenie badań przeglądowych metodami biologii molekularnej jest technicznie możliwe i uzasadnione, gdyż zwiększa bezpieczeństwo przetoczeń [70]. Dalszy rozwój technologii badań molekularnych i opracowanie testów typu multipleks, wykrywających równocześnie materiał genetyczny kilku wirusów, spowodowało, że badania stały się bardziej dostępne do prowadzenia masowych badań przeglądowych w krwiodawstwie. Jednocześnie w wielu krajach pojawiały się liczne informacje mówiące o przeniesieniu zakażenia przez transfuzję krwi i jej składników [71]. W kolejnych krajach rozpoczęto wprowadzenie badań wykorzystujących metodę NAT. Obecnie zgodnie

z krajowymi oraz międzynarodowymi wytycznymi techniki NAT muszą wykrywać w przeliczeniu na pojedynczą donację przynajmniej 10.000 j.m./ml RNA HIV [3–8]. Czas wprowadzania badań za pomocą technik biologii molekularnej w kierunku wirusa HIV-1 w krwiodawstwie w różnych krajach przedstawiono na rycinie 3.

Do dalszej ewolucji badań przyczyniły się dane pochodzące między innymi z Republiki Federalnej Niemiec. W latach 2007–2010 u 6 dawców krwi otrzymano wyniki fałszywie ujemne w testach NAT wykrywających jeden region RNA HIV-1. W celu poprawy czułości diagnostycznej wykrywania RNA HIV-1, a zwłaszcza form polimorficznych, wprowadzono do użytku testy wykrywające jednocześnie przynajmniej dwa konserwatywne regiony (*dual target assay*) genomu wirusa. Badania niemieckie dotyczące okresu 2010–2014 wykazały większą czułość kliniczną wykrywania HIV testami *dual-target* (amplifikacja dwóch regionów genomu wirusa) w porównaniu z tymi, które analizują jeden region genomu wirusa [72, 73].

Zasady i schemat diagnostyki zakażenia HIV w populacji ogólnej nieznacznie różni się w porównaniu z badaniami przeglądowymi dawców krwi. Zgodnie z zaleceniami Polskiego Towarzystwa Naukowego AIDS (PTN AIDS) ten pierwszy rodzaj badań powinien się opierać na badaniach wykonywanych technikami serologicznymi. Zalecane jest stosowanie testów III i IV generacji oraz tak zwanych testów szybkich (*rapid tests*) [61–65]. Od 2017 roku PTN AIDS zaleca stosowanie testów IV generacji jako testów przesiewowych. W wyjątkowych sytuacjach dopuszcza się rozpoznanie zakażenia na podstawie badania HIV-1 RNA [66, 67]. Wynik ujemny testu przesiewowego po 12 tygodniach od ekspozycji wyklucza przeniesienie zakażenia HIV.

Po uzyskaniu wyniku reaktywnego należy wykonać badanie w dwóch powtórzeniach. Jeżeli uzyska się wynik powtarzalnie reaktywny, należy wykonać badanie za pomocą testu potwierdzenia.

Wynik dodatni należy wydać pacjentowi bez zbędnej zwłoki. Podczas wydawania wyniku należy między innymi przypomnieć o profilaktyce przenoszenia zakażeń HIV od osób zakażonych oraz skierować pacjenta do poradni/kliniki [74].

Ewolucja metodyki badań przeglądowych w kierunku HIV w Polsce

Badanie dawców krwi w kierunku anty-HIV rozpoczęto w Polsce w 1986 roku — zbadano wówczas około 5% oddanych donacji. Zgodnie z zaleceniem Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej wykrycie przeciwciał anty-HIV miało być sygnałem do rozpoczęcia powszechnych badań przeglądowych w krwiodawstwie. Po raz pierwszy przeciwciała wykryto we wrześniu 1986 roku, zakażony dawca oddał krew w Stacji Krwiodawstwa w Opolu [dane Instytutu Hematologii i Transfuzjologii (IHIT)]. Początkowo od listopada 1987 roku powszechne badania krwiodawców prowadzono za pomocą testów II generacji wykrywających jedynie przeciwciała anty-HIV-1, średnio po 42 dniach od zakażenia. Jednocześnie oceniano nowe metody i ustalano procedury mające na celu uzyskiwanie wiarygodnych wyników, a także prawidłową interpretację wyników [75]. W celu ujednoczenia postępowania diagnostycznego dotyczącego diagnostyki zakażenia HIV w 1989 roku wydano pierwsze rekomendacje dotyczące profilaktyki i diagnostyki HIV/AIDS dla służby zdrowia w Polsce [76]. W polskim krwiodawstwie w kolejnych latach prowadzono badania za pomocą testów III generacji. Testy EIA IV generacji, wykrywające przeciwciała i antygeny, wprowadzono w 2000 roku. Kolejnym krokiem w kierunku zwiększenia bezpieczeństwa krwi i jej składników było wdrożenie w pierwszym kwartale 2007 roku chemiluminescencyjnych testów IV generacji wykonywanych w pełni automatycznym aparacie. Wdrożenie pełnej automatyzacji ograniczyło ryzyko wystąpienia błędu ludzkiego w trakcie badań [77].

W Polsce pierwsze badanie materiału genetycznego HIV przeprowadzono u dawców, u których w badaniach serologicznych testami typu *Western blot* otrzymano wyniki wątpliwe oraz u osób, które miały kontakt z materiałem pochodzącym od osób zakażonych. Badano DNA wirusa zintegrowane z DNA w mononuklearach dawcy. W żadnym przypadku nie wykryto materiału genetycznego wirusa HIV [78]. Przeglądowe badania NAT u dawców krwi w kierunku RNA HIV, pozwalające wykryć zakażenie przed pojawieniem się markerów serologicznych, rozpoczęto w Polsce w drugiej

połowie 2003 roku. Początkowo wykonywano je tylko w niektórych Centrach Krwiodawstwa, które wykorzystywały do prowadzenia obowiązkowego wówczas badania RNA HCV test *Procleix*, który dodatkowo dawał możliwość detekcji RNA HIV-1. Ponadto od 2003 roku badanie RNA HIV stanowiło dodatkową procedurę, obok testów *Western blot*, stosowaną do weryfikacji wyników powtarzalnie reaktywnych w testach serologicznych [79]. W 2005 roku wprowadzono obowiązek badania RNA HIV w każdej donacji [77, 79].

Pobieranie próbek na badanie przeglądowe w kierunku HIV

Próbki krwi do badań czynników zakaźnych są pobierane z tego samego wkłucia, z którego pobierana jest donacja, w trakcie lub po zakończeniu donacji, do próbek jednorazowego użytku (system próżniowy). Próbki do badań od kandydatów na dawców są pobierane podczas badań kwalifikacyjnych.

Wyniki ujemne są podstawą do kwalifikacji krwi i jej składników do użytku klinicznego [3–8].

Metody

Badania testami serologicznymi zawsze były wykonywane w pojedynczej donacji, technikami NAT w pojedynczej donacji lub w minipulach powstałych po zlaniu równych porcji osocza z „n” próbek dawców ($n = 24$ lub 8 lub 6). Testy i aparatura wykorzystywane do badań posiadały znak CE IVD. Badania przeglądowe prowadzono zgodnie z zaleceniami IHIT, zawartymi w kolejnych wersjach „Medycznych zasad pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujących w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi” [3–5] oraz późniejszych aktach prawnych [6–8]. Przepisy międzynarodowe nie określają zasad konstrukcji testów. Zgodnie z Dyrektywą testy powinny wykrywać najczęściej spotykane podtypy, mutanty, formy zrekombinowane, jak również nowo pojawiające się formy wirusa [42].

Badania serologiczne

Zgodnie z zaleceniami krajowymi oraz międzynarodowymi [3–9] testy serologiczne charakteryzowały się czułością analityczną i kliniczną zbliżoną do 100% oraz swoistością $> 99,5\%$. W latach 2005–2022 w Centrach Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (CKiK) do badań przeglądowych dawców krwi stosowano testy różnych producentów. Zastosowanie metod serologicznych do prowadzenia

badania dawców w poszczególnych CKiK w Polsce w latach 2005–2022 przedstawiono na rycinie 4.

Algorytm badań immunochemicznych w kierunku HIV obowiązujący przez cały okres objęty analizą przedstawiono na rycinie 5. Szczegółowo był on opisywany w kolejnych wersjach rekomendacji obowiązujących w krwiodawstwie (kolejne wersje *Medycznych zasad* [3–5] oraz później *Dobrych praktyk* [6–8]).

Zgodnie z zasadami obowiązującymi w polskim krwiodawstwie po uzyskaniu wyniku reaktywnego (IR, *initially reactive*) w teście przeglądowym należało wykonać badanie w tej samej próbce natępnego dnia w dwóch powtórzeniach. Po uzyskaniu wyniku powtarzalnie reaktywnego (RR) (łącznie przynajmniej dwa wyniki dodatnie w trzech badaniach) próbkę krwi dawcy przesłano na badania weryfikacyjne do IHIT.

Przeglądowe badania NAT w kierunku RNA HIV

Badania NAT w polskim krwiodawstwie od początku ich prowadzenia są wykonywane za pomocą dwóch alternatywnych metod: reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*) i amplifikacji przez transkrypcję (TMA, *transcription mediated amplification*). Istotą reakcji PCR jest namnożenie (amplifikacja) *in vitro* wybranego fragmentu genomu przy użyciu termostabilnej polimerazy DNA (ryc. 6). Ze względu na to, że wirus HIV jest wirusem RNA, pierwszym etapem reakcji musi być odwrotna transkrypcja. Do tego celu stosuje się odwrotną transkryptazę lub polimerazę DNA o własnościach zarówno polimerazy, jak i odwrotnej transkryptazy. Reakcja PCR ma charakter cykliczny — każdy cykl składa się z trzech etapów różniących się temperaturą. Powtórzenie cyklu powoduje podwojenie liczby namnażanego fragmentu DNA. W rzeczywistości wydajność reakcji jest nieco niższa, wynika to między innymi ze spadku aktywności stosowanego w reakcji enzymu polimerazy. Odpowiednie dobranie sekwencji primerów, sond oraz temperatury reakcji warunkuje specyficzność procesu. Wynikiem reakcji PCR jest powstanie kopii badanego fragmentu DNA o ściśle określonej długości i o określonej sekwencji [46]. Odmianą metody PCR jest metoda reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR, *real time-polymerase chain reaction*), która umożliwia wykrywanie tworzącego się produktu amplifikacji w czasie rzeczywistym. Metoda TMA wykorzystuje transkrypcję jako metodę amplifikacji kwasów nukleinowych. Skład mieszaniny

reakcyjnej jest podobny jak w reakcji PCR, ale tu są wykorzystywane dwa enzymy: mysia odwrotna transkryptaza (RT, *murine revers transcriptase*) oraz polimeraza RNA bakteriofaga T7. Schemat reakcji TMA przedstawiono na rycinie 7 [46]. Wydajność reakcji TMA i PCR jest bardzo wysoka — w ciągu godziny liczba cząsteczek kwasu nukleinowego jest z wielokrotnością nawet 10^9 razy. Badania wykonywane w krwiodawstwie są w pełni zautomatyzowane, zmniejsza to zasadniczo ryzyko wyników fałszywych spowodowanych błędem ludzkim.

W tabeli 1 przedstawiono charakterystykę testów wykorzystywanych do prowadzenia badań przeglądowych RNA HIV. Badania w kierunku RNA HIV wykonywano w Pracowniach Biologii Molekularnej (PBM) Centrów Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa. Centra, które nie miały PBM, zlecały badanie do innego CKiK. Informacje dotyczące testów NAT wykorzystywanych do badań przeglądowych w CKiK przedstawiono na rycinie 8. Badania przeglądowe technikami biologii molekularnej były prowadzone w dwóch strategiach:

- a) w pojedynczej donacji (ID) lub;
- b) w minipulach (MP) powstałych przez zlanie porcji osocza z „n” donacji.

Badania prowadzono metodą:

— TMA w:

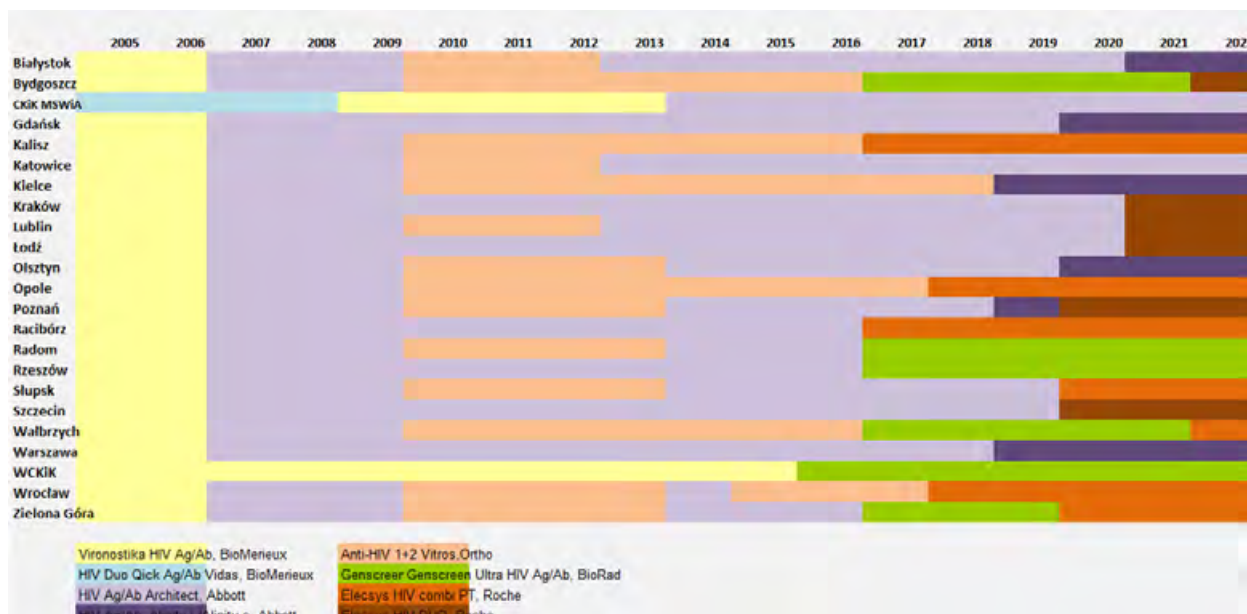
- pojedynczych donacjach (ID) lub
- minipulach złożonych z 8 donacji (w 1 CKiK w latach 2012–2014) lub
- minipulach złożonych z 4 donacji (4 CKiK od 2022 r.);

— PCR w minipulach złożonych z:

- 24 donacji (lata 2005–2006) lub
- 6 donacji (od 2007 r.).

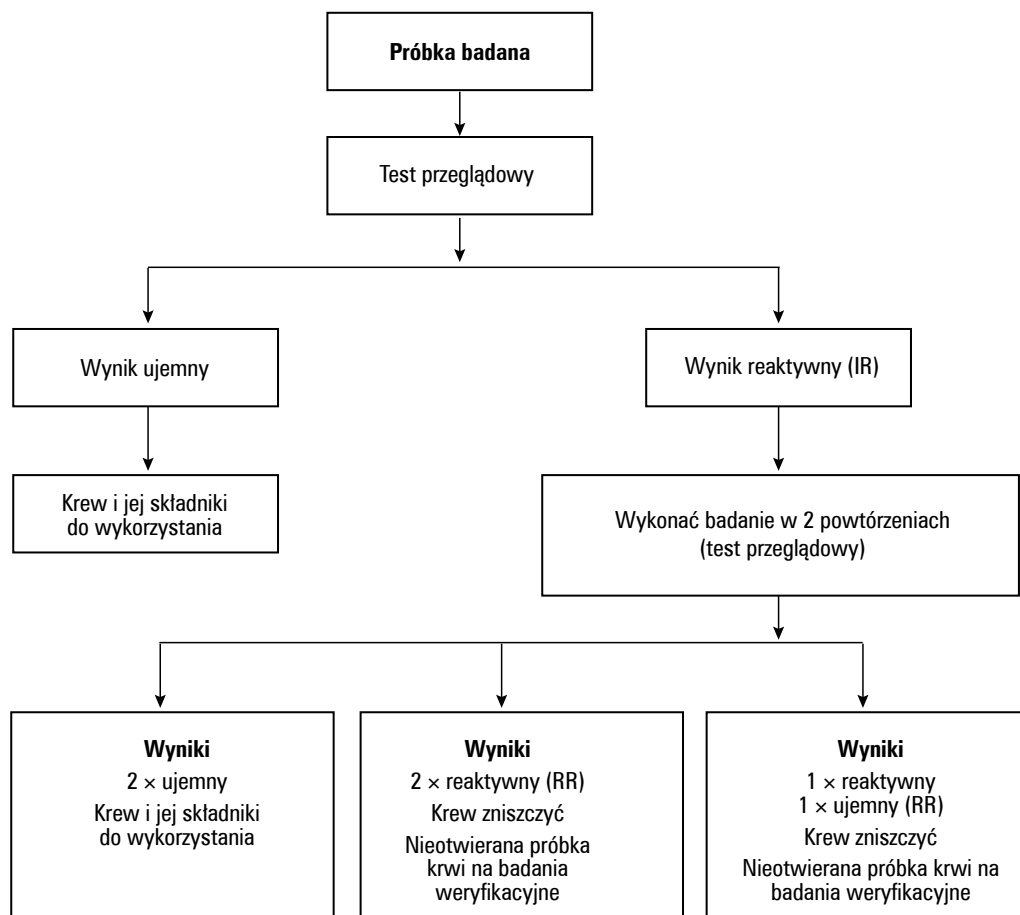
Wszystkie testy przeglądowe poza Ampliscreen HIV były testami typu *multipleks* — ich konstrukcja umożliwiała równoległe wykrycie RNA wirusów HIV i HCV oraz DNA HBV. Otrzymanie wyniku reaktywnego w teście *multipleks* (poza Taqscreen MPX v. 2) wymagało wykonania dodatkowych badań różnicujących, wskazujących obecność, którego z wirusów spowodowała reaktywny wynik testu przeglądowego. W teście Taqscreen MPX v. 2 od razu otrzymywano wynik reaktywny ze wskazaniem, który wirus został wykryty.

Po otrzymaniu wyniku reaktywnego dla puli w trakcie badania przesiewowego metodą TMA wykonywano badania w pojedynczych donacjach wchodzących w jej skład z zastosowaniem testów różnicujących w kierunku poszczególnych wirusów (HIV-1/2, HCV, HBV). W badaniach prowadzonych w pojedynczych donacjach po uzyskaniu wyniku reaktywnego wykonywano badanie w dwóch po-

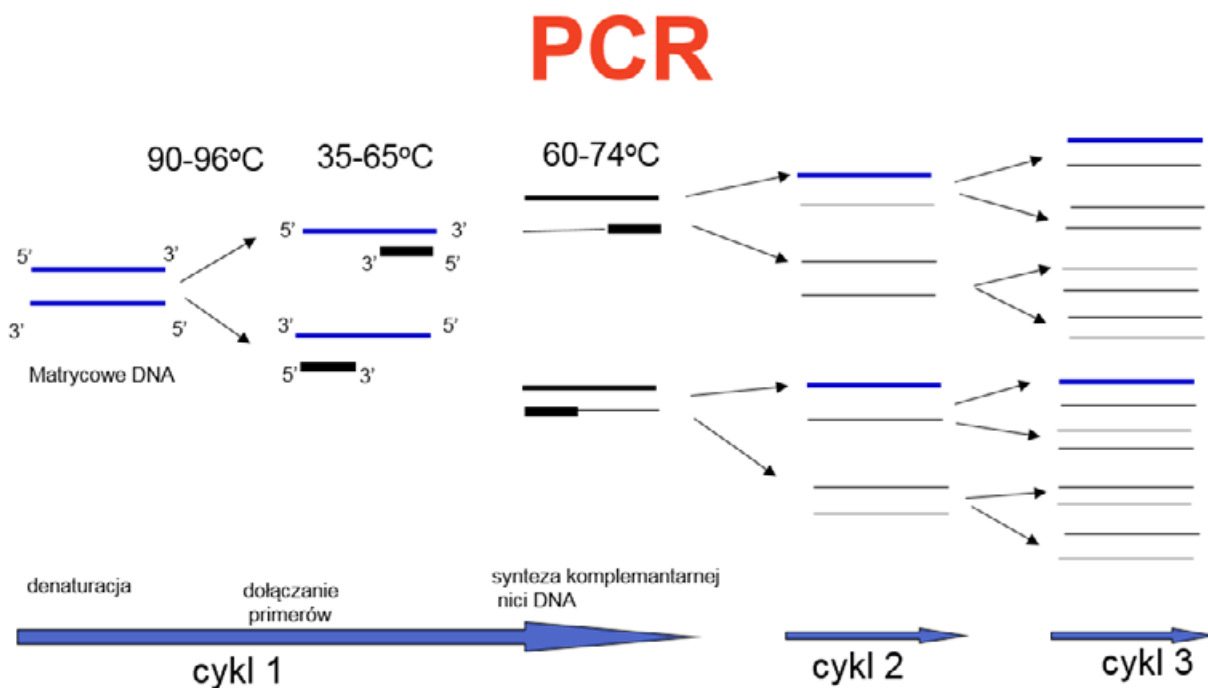


Rycina 4. Metody serologiczne wykorzystywane do badań przeglądowych w krwiodawstwie w Polsce w latach 2005–2022

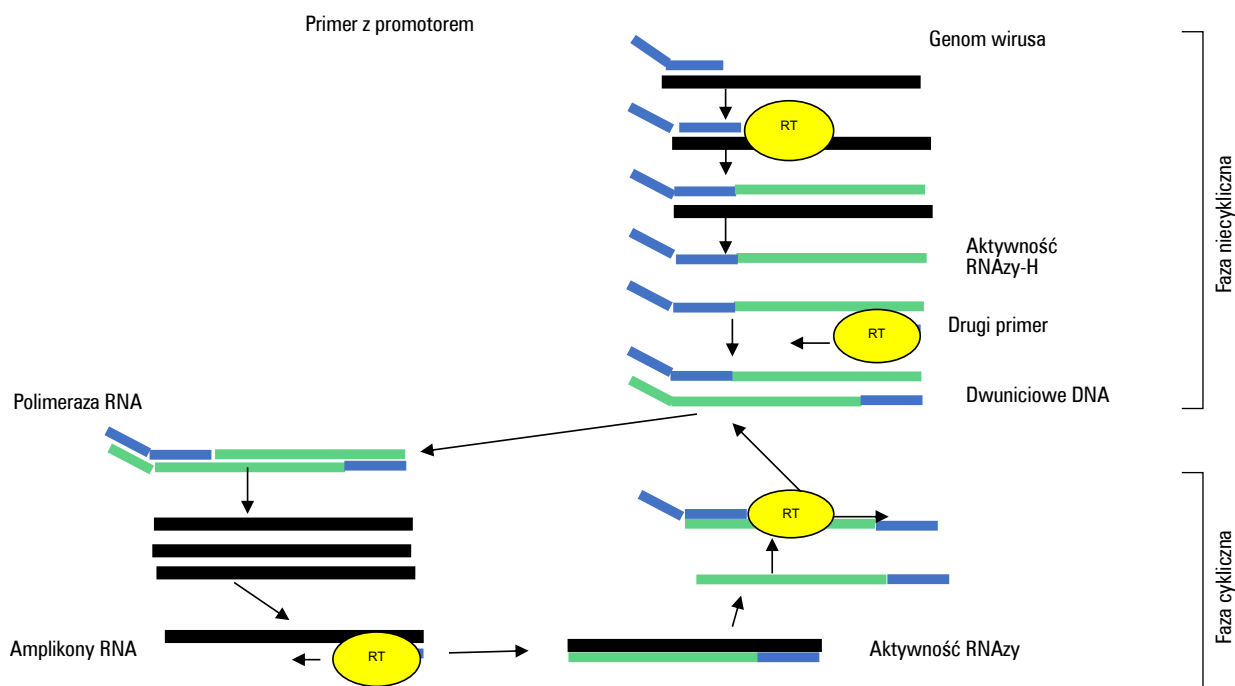
ELISA — test immunoenzymatyczny; ELFA — test enzymofluorescencyjny, CIMA — test chemiluminescencyjny; ECI — test immunoenzymatyczny; ECLIA — test elektrochemiluminescencyjny; CKiK MSWiA — Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa MSWiA, podległe Ministerstwu Spraw Wewnętrznych i Administracji



Rycina 5. Algorytm badań przeglądowych (testy serologiczne) wykonywanych w Centrach Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa



Rycina 6. Schemat reakcji metodą reakcji łańcuchowej polimerazy. Opracowano na podstawie [46]



Rycina 7. Schemat reakcji metodą amplifikacji przez transkrypcję. Opracowanie na podstawie [46]

Tabela 1. Charakterystyka testów wykorzystywanych do prowadzenia badań RNA HIV w Centrach Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w latach 2005–2022 (dane dotyczące czułości na podstawie ulotek do testów)

Test	Format	Czułość dla donacji j.m./ml (95%LOD)	Badania różnicujące	Okres stosowania
TMA				
Procleix Ultrio	IDT	45	Tak	2005–2009
Procleix Ultrio Plus		27,6	Tak	2010–2013
Procleix Ultrio Elite		18	Tak	2014–2022
TMA				
Procleix Ultrio Plus	MP 8	221	Tak	2012–2014
PCR				
Ampliscreen HIV	MP 24	1469	Nie	2005–2007
R-T PCR				
Taqscreen MPX	MP 6	294	Tak	2007–2012
Taqscreen MPX v.2.0		302	Tak	2013–2018
MPX		154,2	Tak	2019–2022
TMA				
Procleix Ultrio Elite	MP 4	72	Tak	2017–2022

IDT — badanie w pojedynczej donacji; cyfra obok MP oznacza, z ilu donacji była złożona minipula, np. MP 8 — badanie w puli złożonej z 8 donacji

wtórzeniach i dodatkowo badanie różnicujące. Jeśli uzyskano wyniki ujemne, dawcy nie dyskwalifikowano, jednak składniki krwi z takiej donacji nie mogły być wykorzystywane do celów klinicznych. Schemat postępowania dla poszczególnych testów przedstawiono na rycinie 9.

W CKiK po uzyskaniu wyniku wstępnie reaktywnego w badaniach wykonywanych techniką PCR (pule po 24 lub 6 donacji) przeprowadzono dalsze badania. W przypadku puli złożonej z 24 donacji w kolejnym etapie przeprowadzono badania 4 subpul, z których każda składała się z osocza pochodzącego z 6 donacji. Po uzyskaniu wyniku reaktywnego w puli złożonej z 6 donacji (subpula) badano pojedyncze donacje wchodzące w skład reaktywnej subpuli. Donacje wchodzące w skład puli z ujemnymi wynikami kwalifikowano do użytku klinicznego. Schemat postępowania przedstawiono na rycinie 10.

Ewolucja strategii badań przeglądowych NAT w Centrach Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa

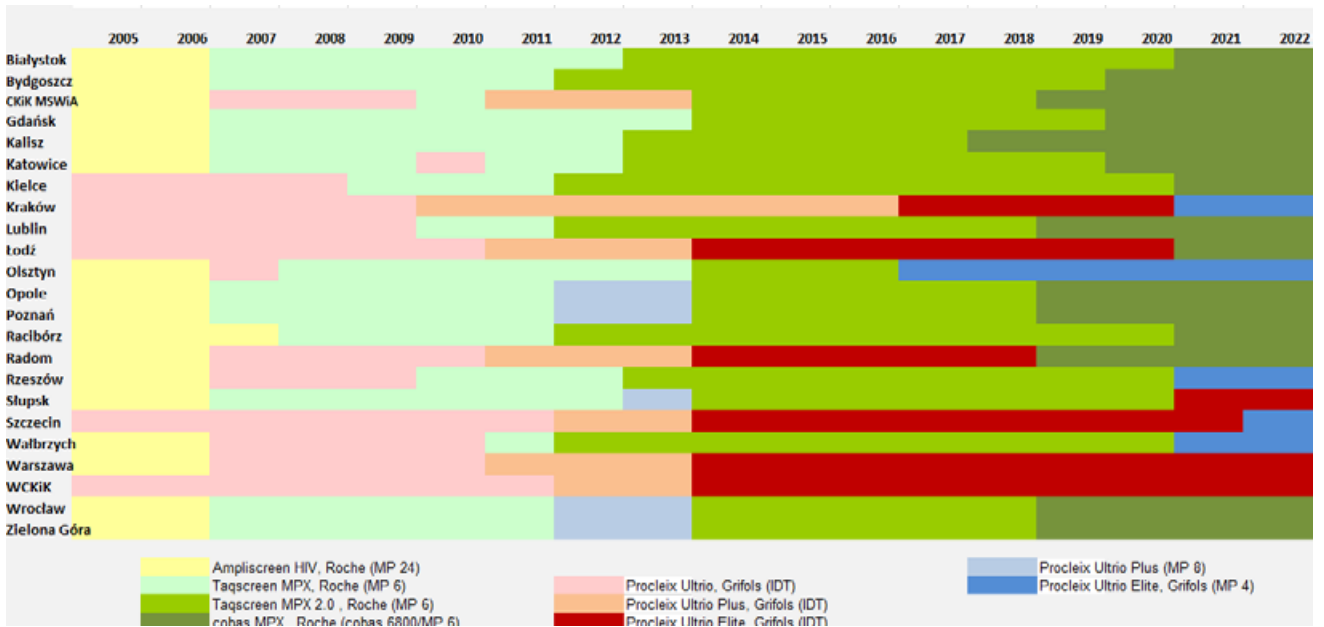
Czułość analityczna testów NAT wykorzystywanych w badaniach RNA HIV w polskim krwiodawstwie zmieniała się wraz z wprowadzaniem kolejnych testów oraz zmianą formatu badania (MP24, 6, 4, IDT). Początkowo w latach 2005–2006 badanie w MP24 miało czułość [szacunkowe 95% LOD] 1469 IU/ml. Po wprowadzeniu w 2007 roku

badania w MP6 testem Cobas Taqscreen czułość analityczna uległa zwiększeniu kilkukrotnie i wynosiła około 300 j.m./ml. W badaniu indywidualnych donacji wykorzystującym TMA od początku czułość analityczna była bardzo wysoka: dla Procleix Ultrio (lata 2005–2009) wynosiła 45 j.m./ml [szacunkowe 95% LOD], dla Procleix Ultrio Plus (2010–2013) 27,6 j.m./ml i najwyższy poziom osiągnęła dla testu Procleix Ultrio Elite (stosowany od 2014 r. do chwili obecnej) — około 18 j.m./ml. Szczegółowe informacje przedstawiono na rycinie 11.

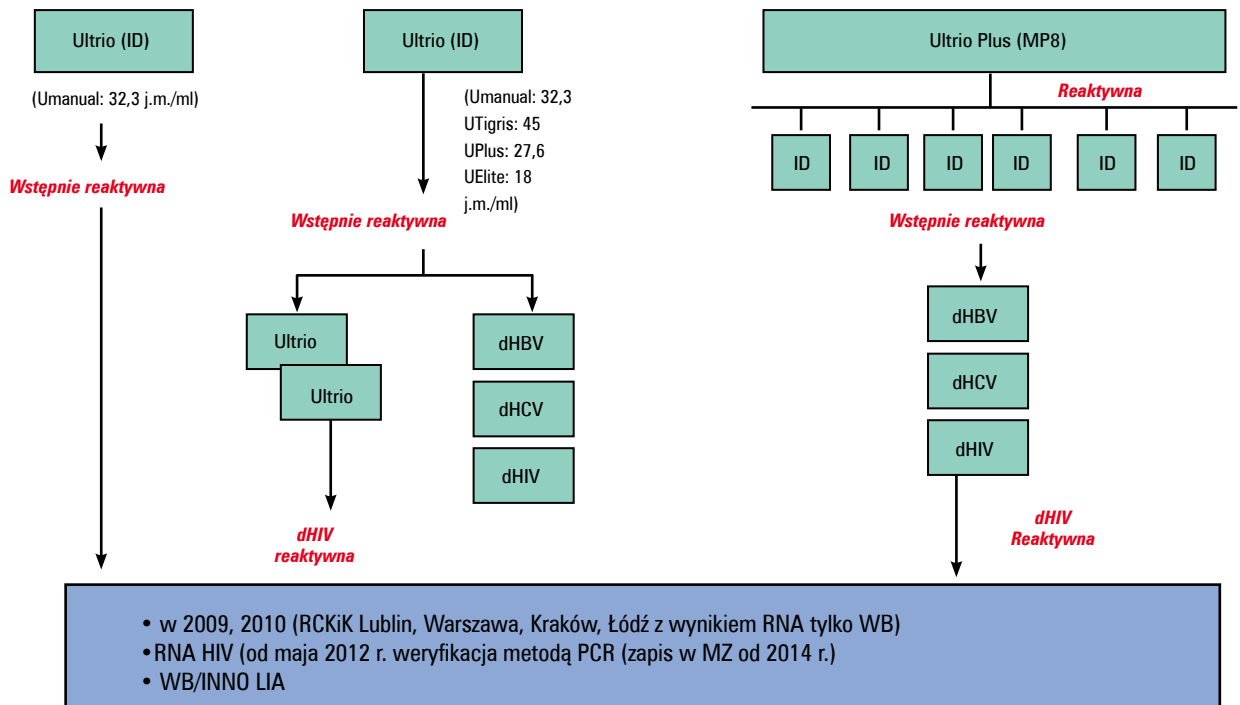
Kontrola jakości badań przeglądowych w latach 2005–2022 w Centrach Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa

W laboratoriach CKiK wykonujących badania przeglądowe czynników zakaźnych przenoszonych przez krew stosowano procedury zapewniające wiarygodność uzyskanych wyników:

- przed rozpoczęciem badań prowadzono ewaluację urządzeń i testów oraz walidację procesów;
- w każdym CKiK bezpośrednio przed rozpoczęciem badań wykonywano walidację procesu z zastosowaniem paneli próbek przygotowanych przez Zakład Wirusologii (ZW) IHiT; udział w takim programie kontroli jakości powtarzano co 12 miesięcy;
- badania wykonywano ściśle według wymogów producentów testów;

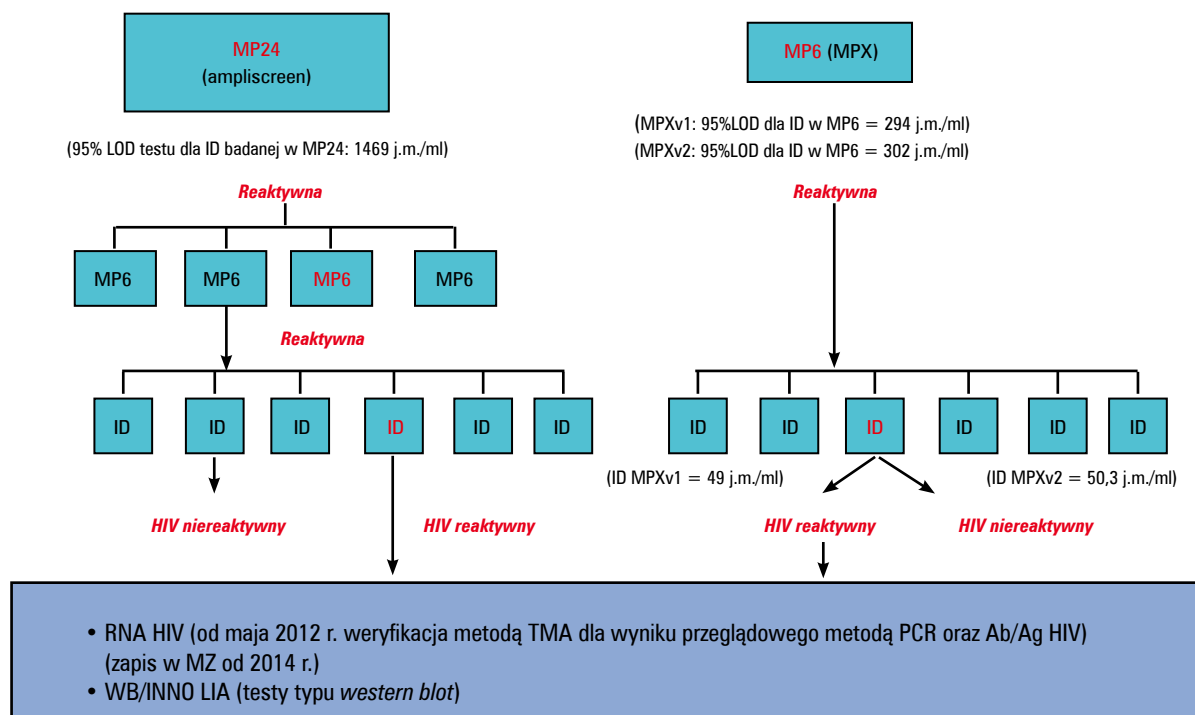


Rycina 8. Metody biologii molekularnej wykorzystywane do badań przeglądowych w krwiodawstwie w Polsce w latach 2005–2022; CKiK MSWiA — Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa MSWiA, podległe Ministerstwu Spraw Wewnętrznych i Administracji



Rycina 9. Postępowanie w Centrach Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa po otrzymaniu reaktywnego wyniku badania przeglądowego — badanie metodą amplifikacji przez transkrypcję (dane dotyczące czułości na podstawie ulotek do testów) ID — pojedyncza donacja; dHBV — dyskryminacja HBV; dHCV — dyskryminacja HCV; dHIV — dyskryminacja HIV; RNA — kwas rybonukleinowy; WB — test *western blot*; MZ — Ministerstwo Zdrowia; WB/INNO LIA — testy typu *western blot*

- wszystkie laboratoria uczestniczyły w programie zewnętrznej kontroli jakości oraz w programie codziennej zewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości EDCNet;
- wszystkie laboratoria były audytowane regularnie co 2 lata.



Rycina 10. Schemat postępowania w Centrach Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa po otrzymaniu reaktywnego wyniku w badaniu przeglądowym prowadzonym metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (dane dotyczące czułości na podstawie ulotek do testów ID — pojedyncza donacja; dHBV — dyskryminacja HBV; dHCV — dyskryminacja HCV; dHIV dyskryminacja HIV; RNA — kwas rybonukleinowy; WB — test *western blot*; MZ — Ministerstwo Zdrowia; WB/INNO Lia — testy typu *western blot*)

Badania weryfikacyjne

Na badania weryfikacyjne do ZW IHiT przysyłano próbki krwi pochodzące od dawców, u których w badaniach przeglądowych prowadzonych metodami serologicznymi lub/i NAT otrzymano wynik lub wyniki powtarzalnie reaktywne.

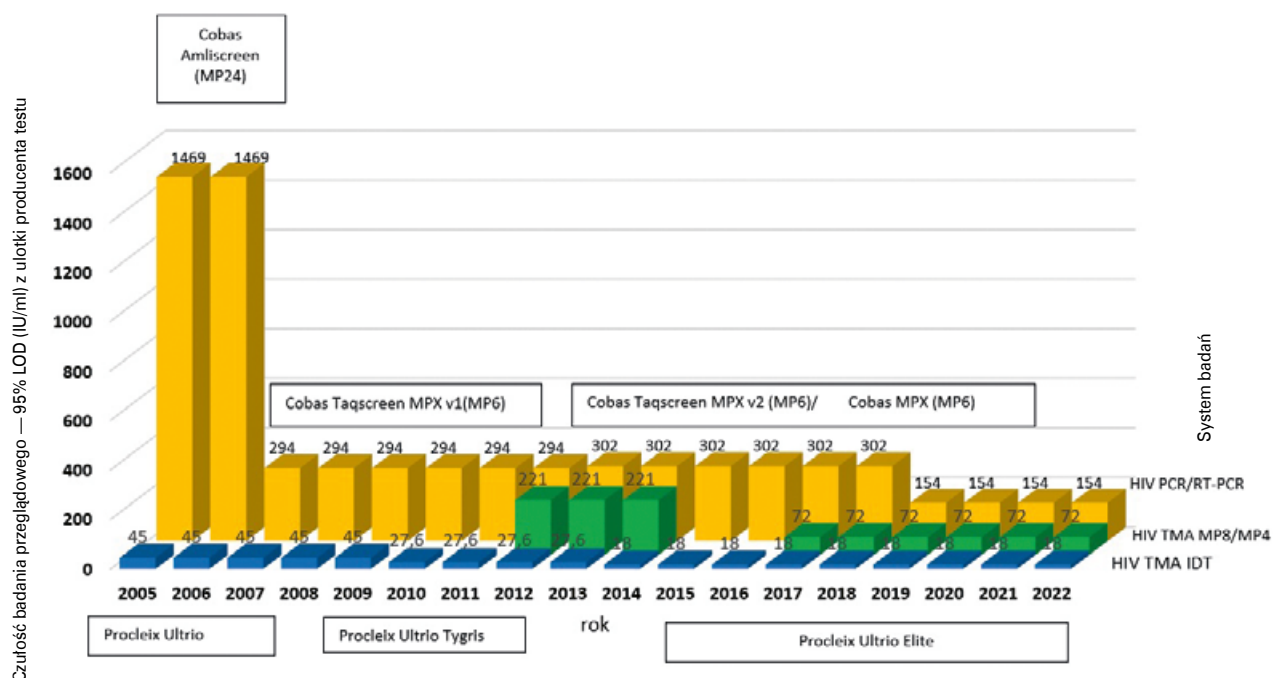
Badania weryfikacyjne służyły potwierdzeniu lub wykluczeniu zakażenia wirusem HIV — próbki z wynikami powtarzalnie reaktywnymi w badaniach przeglądowych metodami serologicznymi lub/i NAT analizowano w testach typu WB oraz dodatkowo badano materiał genetyczny wirusa HIV (zawsze w indywidualnych donacjach). Schemat postępowania w trakcie procesu weryfikacji przedstawiono na rycinie 12. W maju 2012 roku do algorytmu badań weryfikacyjnych prowadzonych technikami NAT wprowadzono obowiązek badania RNA HIV inną metodą niż wykonano badanie przeglądowe. Jeśli badanie przeglądowe wykonywano techniką PCR, to w ZW IHiT wykonywano badanie metodą TMA, natomiast jeśli badanie przeglądowe wykonywano metodą TMA, to badanie weryfikacyjne prowadzono metodą PCR. Wprowadzenie tej rekomendacji było podyktowane występowaniem przypadków form polimorficznych niewykrywanych w NAT i miało uchronić przed wynikami fałszywie negatywnymi (tzw. *escape mutants*).

W przypadku, kiedy nie potwierdzono zakażenia, pierwsza dyskwalifikacja czasowa była nakładana na dawcę na okres 6 miesięcy. Po kolejnych wynikach nierozstrzygających badania weryfikacyjnego okres dyskwalifikacji był wydłużany na kolejne 6 miesięcy do ponad 2 lat. Do oddawania krwi dawcę przywracano, gdy wyniki badania przeglądowego i testu potwierdzenia były zgodne ujemne. W przypadku długotrwałego utrzymywania się wyników nieswoistych nie była nakładana dyskwalifikacja stała, ale długotrwała dyskwalifikacja czasowa (np. na 2–5 lat). Dyskwalifikację stałą nakładano wyłącznie w przypadku potwierdzenia zakażenia wirusem HIV.

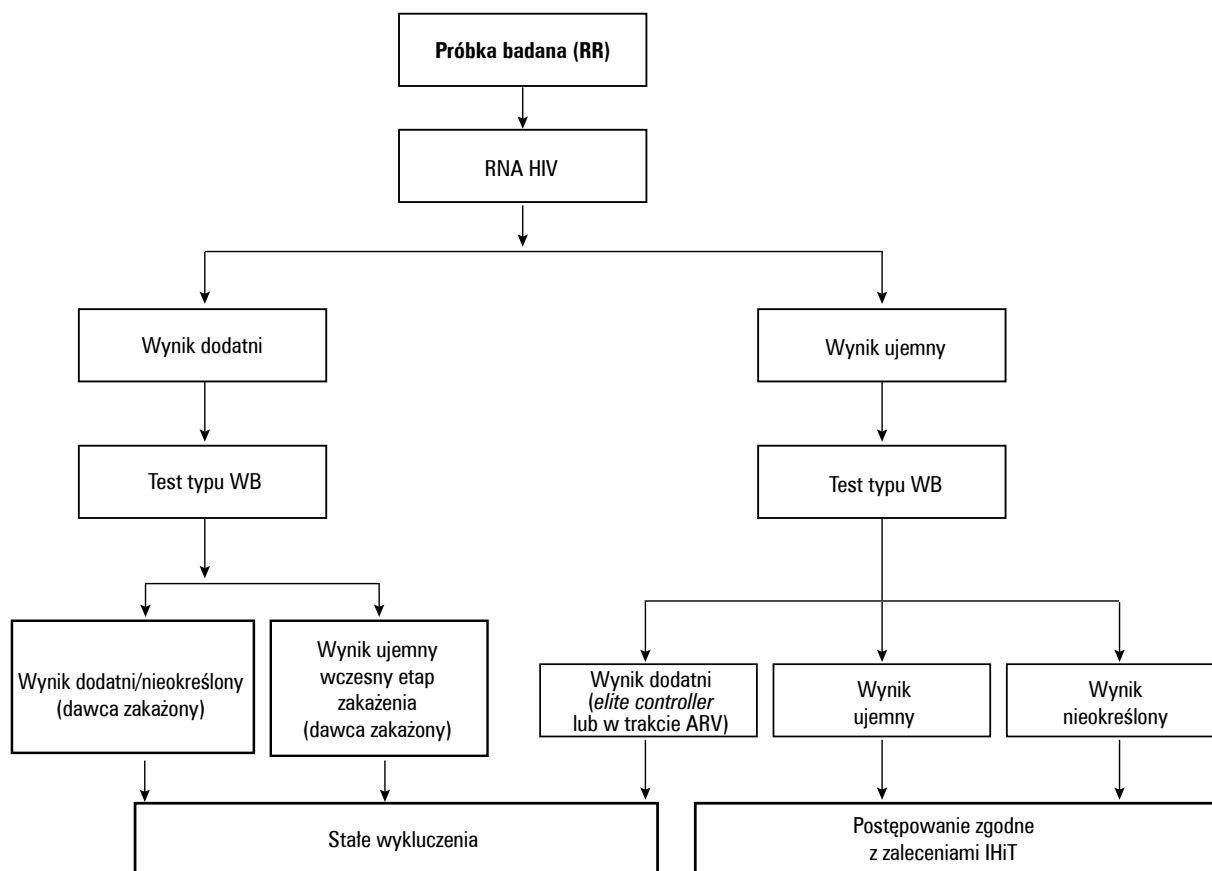
Do badań weryfikacyjnych metodami serologicznymi w trakcie okresu objętego obecną analizą wykorzystywano testy typu WB różnych producentów (tab. 2). Testy do wykrywania RNA HIV-1/2 stosowane w badaniach weryfikacyjnych przedstawiono w tabeli 3.

Ryzyko resztkowe przeniesienia HIV przez transfuzje i metody jego ograniczania

Mimo prowadzenia badań przeglądowych, wciąż istnieje ryzyko przeniesienia zakażenia HIV przez transfuzję krwi i jej składniki (tzw. ryzyko



Rycina 11. Czułość analityczna badań technikami NAT w kierunku RNA HIV w polskim krwiodawstwie w latach 2005–2022 (dane dotyczące czułości na podstawie ulotek do testów)



Rycina 12. Algorytm postępowania weryfikacyjnego po stwierdzeniu wyniku powtarzalnie reaktywnego HIV-1/2 w badaniach przeglądowych; IHiT — Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Tabela 2. Testy typu WB wykorzystywane w Zakładzie Wirusologii w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii do badań potwierdzających zakażenie wirusem HIV w latach 2005–2022

Lata	Nazwa testu (producent, kraj)
2005–2006	HIV BLOT 2.2 (Genelabs® Diagnostics, Singapur)
2007–2008	HIV-1 BLOT 1.3 (Genelabs® Diagnostics, Singapur)
2009	HIV BLOT 2.2 (Genelabs® Diagnostics, Singapur)
2010	INNO-LIA™ HIV I/II Score (Innogenetics, Belgia)
2011–2012	HIV BLOT 2.2 (MP Diagnostics, Singapur)
2013	HIV BLOT 2.2 (MP Diagnostics, Singapur) INNO-LIA™ HIV I/II Score (Innogenetics, Belgia)
2014	INNO-LIA™ HIV I/II Score (Innogenetics, Belgia)
2015–2022	recomLine HIV-1& HIV-2 IgG (Mikrogen, Niemcy)
od 10.2022	INNO-LIA™ HIV I/II Score (Fujirebio, Belgia)

Tabela 3. Testy NAT wykorzystywane w badaniach weryfikacyjnych w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii w latach 2005–2022 (dane dotyczące czułości na podstawie ulotek do testów)

Lata	Nazwa testu (producent, kraj)	Czułość dla donacji j.m./ml (95%LOD)	Liczba amplifikowanych regionów
2005–2006	Procleix Ultrio (Gen-probe, USA)	32,3 j.m./ml	Brak danych*
2007–2009	Procleix Ultrio (Gen-probe, USA)	32,3 j.m./ml	Brak danych*
	Cobas Ampliscreen HIV-1 v 1.5 (Roche, USA)	61,2 j.m./ml	Brak danych*
2010	Procleix Ultrio (Gen-probe, USA)	32,3 j.m./ml	Brak danych*
	Procleix Ultrio Plus (Gen-probe, USA)	28,6 j.m./ml	Brak danych*
2011–2013	Cobas Ampliscreen HIV-1 v 1.5 (Roche, USA)	61,2 j.m./ml	Brak danych*
	Procleix Ultrio Plus (Gen-probe, USA)	28,6 j.m./ml	Brak danych*
2014	Cobas Ampliscreen HIV-1 v 1.5 (Roche, USA)	61,2 j.m./ml	Brak danych*
	Procleix Ultrio Elite (Gen-probe, USA)	18 j.m./ml	2
2015–2021	Confirmatory PCR Kit HIV-1 v 1.1 (GFE Blut, Germany)	89,5 j.m./ml	3
	Procleix Ultrio Elite (Gen-probe, USA)	18 j.m./ml	2
Od 11.2021 r.	Confirmatory PCR Kit HIV-1 v 1.2 (GFE Blut, Germany)	13,7 j.m./ml	3
	Procleix Ultrio Elite (Gen-probe, USA)	18 j.m./ml	2
	artus® HI Virus – 1 RG RT-PCR KIT (Qiagen, Niemcy)	66,9 j.m./ml	1

*Brak informacji w ulotce do testów

resztkowe). Jednym ze sposobów ograniczania tego ryzyka jest wprowadzenie dyskwalifikacji kandydatów na dawców oraz dawców, którzy zgłosili w ankiecie poprzedzającej donację lub podczas wywiadu lekarskiego zachowania i okoliczności związane ze zwiększonym ryzykiem zakażenia. Wprowadzenie badań przeglądowych prowadzonych technikami serologicznymi oraz NAT radykalnie zwiększyło bezpieczeństwo krwi i jej składników. Bruhn i wsp. przeprowadzili szacunki skuteczności badań przesiewowych (zakładając alternatywnie dwie wartości dawki zakaźnej $ID_{50} = 3,16$ wirionów i $ID_{50} = 316$ wirionów) dla KKCz w donacjach pochodzących

od dawców pierwszorazowych i wielokrotnych dla różnych strategii badań we wszystkich regionach świata [80].

Skuteczność badań przesiewowych w donacjach dawców pierwszorazowych wzrasta z 98,73%, gdy badania przeglądowe są wykonywane za pomocą testów wykrywających przeciwciała anty-HIV do 99,78%, gdy są wykonywane zarówno testy ID-NAT, jak i testy na obecność przeciwciała. W donacjach pochodzących od dawców wielokrotnych skuteczność ta waha się od 86,7% dla donacji badanych tylko na obecność przeciwciała anty-HIV do 97,68%, gdy jest stosowana bardziej efektywna

strategia badań ID-NAT/Ab+ [80]. Lelie i wsp. oszacowali okres okienka diagnostycznego dla testu Ultrio Elite na platformie Panther (badanie w pojedynczej donacji) na 4 dni, a dla testu MPX na platformie cobas 6800 (badanie w minipuli złożonej z 6 donacji) na 5,7 dni. Obecnie ryzyko resztkowe (rezydualne) rozumiane jako ryzyko przeniesienia zakażenia mimo prowadzenia badań przeglądowych i zachowania wszystkich środków kontroli i dobrych praktyk dla dawców wielokrotnych w krajach rozwiniętych, w tym w Polsce, wynosi $< 1/1\ 000\ 000$ donacji.

Stan obecny i perspektywy badań w kierunku wirusa HIV wśród dawców krwi

Wydaje się, że obecnie obowiązujący schemat badań przeglądowych oraz weryfikacyjnych jest wystarczający, aby zapewnić bezpieczeństwo przetoczeń krwi i jej składników. Na podstawie analizy ryzyka resztkowego wydaje się, że dalsze zwiększanie czułości testów NAT nie wpłynie na zwiększenia bezpieczeństwa krwi. Poziom ryzyko resztkowego jest akceptowalny i nie uzasadnia zwiększania kosztów badań przeglądowych, będącego następstwem zwiększenia ich czułości.

Konflikt interesów: nie zgłoszono

Piśmiennictwo

1. <http://aidsinfo.unaids.org>.
2. https://aids.gov.pl/hiv_aids/450-2-2/.
3. Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby, pod red. M. Łętowskiej. Wydanie I, Warszawa 2006.
4. Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby, pod red. M. Łętowskiej. Wydanie II. Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa 2011.
5. Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby, pod red. M. Łętowskiej. Wydanie III, Warszawa 2014.
6. Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 9 czerwca 2017 r. w sprawie wymagań dobrej praktyki pobierania krwi i jej składników, badania, preparatyki, przechowywania, wydawania i transportu dla jednostek organizacyjnych publicznej służby krwi, 2017.
7. Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 6 marca 2019 w sprawie wymagań dobrej praktyki pobierania krwi i jej składników, badania, preparatyki, przechowywania, wydawania i transportu dla jednostek organizacyjnych publicznej służby krwi, 2019.
8. Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 30 marca 2021 w sprawie wymagań dobrej praktyki pobierania krwi i jej składników, badania, preparatyki, przechowywania, wydawania i transportu dla jednostek organizacyjnych publicznej służby krwi, 2021.
9. Dyrektywa 2002/98/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 27 stycznia 2003 r. ustanawiająca normy jakości i bezpiecznego pobierania, testowania, przetwarzania, przechowywania i dystrybucji krwi ludzkiej i składników krwi oraz zmieniająca dyrektywę 2001/83/WE 2003.
10. Dyrektywa Komisji 2004/33/WE z dnia 22 marca 2004 wykonująca dyrektywę 2002/98/WE Parlamentu Europejskiego w zakresie niektórych wymagań technicznych dotyczących krwi i jej składników, 2004.
11. Dyrektywa Komisji 2005/61/WE z dnia 30 września 2005 wykonująca dyrektywę 2002/98/WE Parlamentu Europejskiego w zakresie wymogów dotyczących śledzenia losów krwi oraz powiadamiania o poważnych, niepożądanych reakcjach i zdarzeniach, 2005.
12. Dyrektywa Komisji 2005/62/WE z dnia 30 września 2005 wykonująca dyrektywę 2002/98/WE Parlamentu Europejskiego w zakresie norm i specyfikacji wspólnotowych odnoszących się do sytemu jakości obowiązującego w placówkach służby krwi, 2005.
13. WHO. Screening donated blood for transfusion-transmissible infections: recommendations. ISBN 978 92 4 154788 8.
14. FDA. <https://www.fda.gov>.
15. Ferreira M, Nel T. Differential transmission of human immunodeficiency virus (HIV) via blood components from an HIV-infected donor. *Transfusion*. 2005; 46(1): 156–157, doi: [10.1111/j.1537-2995.2006.00688.x](https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2006.00688.x), indexed in Pubmed: [16398747](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16398747/).
16. Zanetti AR, Bodini U, Clerici M, et al. Transfusion of red blood cells from an HIV-RNA-positive/anti-HIV-negative donor without HIV infection in the recipient. *Transfusion*. 2007; 47(7): 1328–1329, doi: [10.1111/j.1537-2995.2007.01298.x](https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01298.x), indexed in Pubmed: [17581171](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17581171/).
17. Kalus U, Edelmann A, Pruss A, et al. Noninfectious transfusion of platelets donated before detection of human immunodeficiency virus RNA in plasma. *Transfusion*. 2009; 49(3): 435–439, doi: [10.1111/j.1537-2995.2008.02012.x](https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2008.02012.x), indexed in Pubmed: [19040413](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19040413/).
18. Schmidt M, Korn K, Nübling C, 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(9): 1836–1844, doi: [10.1111/j.1537-2995.2009.02203.x](https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02203.x), indexed in Pubmed: [19453990](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19453990/).
19. Álvarez M, Luis-Hidalgo M, Bracho MA, et al. Transmission of human immunodeficiency virus Type-1 by fresh-frozen plasma treated with methylene blue and light. *Transfusion* 2016; 56(4): 831–836, doi: [10.1111/trf.13409](https://doi.org/10.1111/trf.13409), indexed in Pubmed: [26585542](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26585542/).
20. CDC. Pneumocystis pneumonia—Los Angeles. *MMWR* 1981; 30(25): 250–252.
21. CDC. Kaposi's sarcoma and pneumocystis pneumonia among homosexual men – New York City and California. *MMWR* 1981; 30(5): 305–308.
22. CDC A. CDC. A cluster of Kaposi's sarcoma and Pneumocystis carinii Pneumonia among homosexual male Resident of Los Angeles City and range Counties, California. *MMWR* 1982; 31(5): 305–307.
23. CDC. Current Trends Update on Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) — United States. *MMWR* 1982; 31(5): 507–508.
24. CDC. Epidemic Notes and Reort Possible transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome (AIDS) – California. *MMWR* 1982; 31(5): 652–654.

25. CDC. Opportunistic Infections and Kaposi's sarcoma among Haitians in the United States MMWR 1982: 353–354.
26. CDC. Update on acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) among patients with hemophilia A. MMWR 1982: 644–652.
27. CDC. Unexplained Immunodeficiency and opportunistic infections in infants. New York, New Jersey, California MMWR 1982, 665–667.
28. CDC. Current trends acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). MMWR 1983; 309–311.
29. CDC. Current trends prevention of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): report of inter-agency recommendations. MMWR 1983; 101–103.
30. Goodman J. The safety and availability of blood and tissues — progress and challenges. *N Engl J Med.* 2004; 351(8): 819–822, doi: [10.1056/nejme048146](https://doi.org/10.1056/nejme048146), indexed in Pubmed: [15317896](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15317896/).
31. Leveton LB, Sox HC, Stoto MA. HIV and the blood supply: an analysis of crisis decisionmaking: Academy Press (US); 1995. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK232419/>, doi: [10.17226/4989](https://doi.org/10.17226/4989), indexed in Pubmed: [25121199](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25121199/).
32. Barré-Sinoussi F. HIV/Aids: the exemplary history of an epidemic which resists. *Med Sci (Paris)* 2018; 34(6-7): 499–500, doi: [10.1051/medsci/20183406001](https://doi.org/10.1051/medsci/20183406001), indexed in Pubmed: [30067222](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30067222/).
33. Marks PW. The blood supply and men who have sex with men. *N Engl J Med.* 2017; 376(15): 1486–1487, doi: [10.1056/nejmc1701828](https://doi.org/10.1056/nejmc1701828), indexed in Pubmed: [28406277](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28406277/).
34. Culliton B. Five firms with the right stuff. *Science.* 1984; 225(4667): 1129–1129, doi: [10.1126/science.225.4667.1129](https://doi.org/10.1126/science.225.4667.1129), indexed in Pubmed: [17782407](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17782407/).
35. Coffin J, Haase A, Levy J, et al. Human immunodeficiency viruses. *Science.* 1986; 232(4751): 697–697, doi: [10.1126/science.3008335](https://doi.org/10.1126/science.3008335), indexed in Pubmed: [3008335](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3008335/).
36. Vahlne A. A historical reflection on the discovery of human retroviruses. *Retrovirology.* 2009; 6(1), doi: [10.1186/1742-4690-6-40](https://doi.org/10.1186/1742-4690-6-40), indexed in Pubmed: [19409074](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19409074/).
37. Weiss SH. Screening test for HTLV-III (AIDS agent) antibodies. Specificity, sensitivity, and applications. *JAMA: The Journal of the American Medical Association.* 1985; 253(2): 221–225, doi: [10.1001/jama.253.2.221](https://doi.org/10.1001/jama.253.2.221).
38. CDC. Provisional public health service inter-agency recommendations for screening donated blood and plasma for antibody to the virus causing acquired immunodeficiency syndrome. MMWR 1985: 1-5.
39. CDC. Perspectives in disease prevention and healthpromotion public health service guidelines for counseling and antibody testing to prevent HIV infection and AIDS MMWR 1987: 509–515.
40. Gurtler L, Aepfelbacher M, Bauerfeind U, et al. Human immunodeficiency virus (HIV). *Transfus Med Hemother.* 2016; 43(3): 203–222, doi: [10.1159/000445852](https://doi.org/10.1159/000445852), indexed in Pubmed: [27403093](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27403093/).
41. Hoffmann C (ed.). HIV 2015/16. ISBN: 978-3-941727-17-5. Medizin Fokus Verlag, Hamburg 2015.
42. Dyrektywa 98/79/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 27 października 1998 r. w sprawie wyrobów medycznych używanych do diagnozy in vitro. 1998.
43. Decyzja Komisji z dnia 3 lutego 2009 r. zmieniająca decyzję 2002/364/WE w sprawie wspólnych specyfikacji technicznych dla wyrobów medycznych używanych do diagnozy in vitro. 2009.
44. (CDC) CfDC. Interpretation and use of the western blot assay for serodiagnosis. *Morbidity & Mortality Weekly Report* 1989.
45. Shaw GM, Hunter E. HIV Transmission. *Cold spring harbor perspectives in medicine.* 2012; 2(11): a006965–a006965, doi: [10.1101/cshperspect.a006965](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006965), indexed in Pubmed: [23043157](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23043157/).
46. Brojer EG. (red). Czynniki zakaźne istotne w transfuzjologii. Fundacja Pro Pharmacia Futura, 2015.
47. Gan S, Patel K. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Invest Dermatol.* 2013; 133(9): 1–3, doi: [10.1038/jid.2013.287](https://doi.org/10.1038/jid.2013.287), indexed in Pubmed: [23949770](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23949770/).
48. SeraCare. Technical Guide for ELISA. [guide-kpl-elisa-technical-guide pdf](https://www.seracare.com/~/media/seracare/Technical-Guide-for-ELISA.pdf), 2013.
49. Barrett J, Dawson G, Heller J, et al. Performance evaluation of the abbot HTLV III EIA, a test for antibody to HTLV III in donor blood. *Am J Clin Pathol.* 1986; 86(2): 180–185, doi: [10.1093/ajcp/86.2.180](https://doi.org/10.1093/ajcp/86.2.180), indexed in Pubmed: [3017089](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3017089/).
50. Alexander T. Human immunodeficiency virus diagnostic testing: 30 years of evolution. *Clin Vaccine Immunol.* 2016; 23(4): 249–253, doi: [10.1128/cvi.00053-16](https://doi.org/10.1128/cvi.00053-16), indexed in Pubmed: [26936099](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26936099/).
51. Heckler M. The Challenge of the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med.* 1985; 103(5): 655, doi: [10.7326/0003-4819-103-5-655](https://doi.org/10.7326/0003-4819-103-5-655), indexed in Pubmed: [2996394](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2996394/).
52. Peters P, Westheimer E, Cohen S, et al. Screening yield of HIV antigen/antibody combination and pooled HIV RNA testing for acute HIV infection in a high-prevalence population. *JAMA.* 2016; 315(7): 682–690, doi: [10.1001/jama.2016.0286](https://doi.org/10.1001/jama.2016.0286), indexed in Pubmed: [26881371](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26881371/).
53. Gurtler L, Mühlbacher A, Michl U, et al. Reduction of the diagnostic window with a new combined p24 antigen and human immunodeficiency virus antibody screening assay. *J Virol Methods.* 1998; 75(1): 27–38, doi: [10.1016/s0166-0934\(98\)00094-9](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(98)00094-9), indexed in Pubmed: [9820572](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9820572/).
54. Yerly S, Simon F, Perrin L. Early diagnosis of primary HIV infections: using a combined screening test (p24 antigen and anti-HIV antibodies). *Schweiz Med Wochenschr.* 1999; 129(8):319–322.
55. Liniacki A, Piasek A. Diagnostyka laboratoryjna zakażeń HIV. *Przegl Lek* 2003; 478–484, indexed in Pubmed: [14750423](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14750423/).
56. Weber B, Thorstensson R, Tanprasert S, et al. Reduction of the diagnostic window in three cases of human immunodeficiency-1 subtype E primary infection with fourth-generation HIV screening assays. *Vox Sanguinis.* 2003; 85(2): 73–79, doi: [10.1046/j.1423-0410.2003.00334.x](https://doi.org/10.1046/j.1423-0410.2003.00334.x), indexed in Pubmed: [12925157](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12925157/).
57. Ferroni P, Tagger A, Pasquali M, et al. Antibody screening and confirmatory testing of Italian blood donors. One-year experience of a reference center. *Vox Sang.* 1988; 55(3): 143–147, doi: [10.1111/j.1423-0410.1988.tb05081.x](https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1988.tb05081.x), indexed in Pubmed: [3238947](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3238947/).
58. Hofbauer JM, Schulz TF, Hengster P, et al. Comparison of Western blot (immunoblot) based on recombinant-derived p41 with conventional tests for serodiagnosis of human immunodeficiency virus infections. *J Clin Microbiol.* 1988; 26(1): 116–120, doi: [10.1128/jcm.26.1.116-120.1988](https://doi.org/10.1128/jcm.26.1.116-120.1988), indexed in Pubmed: [3277988](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3277988/).
59. Lelie PN, Reesink HW, Huisman H. Evaluation of three second-generation and three confirmatory assays for antibodies to human immunodeficiency virus. *Vox Sang.* 1988; 54(2): 84–91, doi: [10.1111/j.1423-0410.1988.tb01622.x](https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1988.tb01622.x), indexed in Pubmed: [3287766](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3287766/).
60. ECPAobTC-P-T. Guide to the preparation, use and quality assurance of Blood components, 2015.
61. AIDS PTN. Zasady Opieki nad osobami zakażonymi HIV, 2007.
62. AIDS PTN. Zasady opieki nad osobami zakażonymi HIV, 2011.
63. AIDS PTN. Zasady opieki nad osobami zakażonymi HIV, 2013.

64. AIDS PTN. Zasady opieki nad osobami zakażonymi HIV, 2015.
65. AIDS PTN. Zasady opieki nad osobami zakażonymi HIV, 2016.
66. AIDS PTN. Zasady opieki nad osobami zakażonymi HIV, 2017.
67. AIDS PTN. Zasady opieki nad osobami zakażonymi HIV, 2018.
68. Shaw G, Hahn B, Arya S, et al. Molecular characterization of human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type III in the acquired immune deficiency syndrome. *Science*. 1984; 226(4679): 1165–1171, doi: [10.1126/science.6095449](https://doi.org/10.1126/science.6095449), indexed in Pubmed: [6095449](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6095449/).
69. AuBuchon JP, Birkmeyer JD, Busch MP. Cost-effectiveness of expanded human immunodeficiency virus-testing protocols for donated blood. *Transfusion*. 1997; 37(1): 45–51, doi: [10.1046/j.1537-2995.1997.37197176950.x](https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1997.37197176950.x), indexed in Pubmed: [9024489](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9024489/).
70. Cardoso MS, Koerner K, Kubanek B. Mini-pool screening by nucleic acid testing for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and HIV: preliminary results. *Transfusion*. 1998; 38(10): 905–907, doi: [10.1046/j.1537-2995.1998.381098440853.x](https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1998.381098440853.x), indexed in Pubmed: [9767739](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9767739/).
71. Roth W. History and future of nucleic acid amplification technology blood donor testing. *Transfus Med Hemother*. 2019; 46(2): 67–75, doi: [10.1159/000496749](https://doi.org/10.1159/000496749), indexed in Pubmed: [31191192](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31191192/).
72. 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*. 2011; 52(2): 431–439, doi: [10.1111/j.1537-2995.2011.03281.x](https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03281.x), indexed in Pubmed: [21810100](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21810100/).
73. Hourfar K, Eberle J, Müller M, et al. Human immunodeficiency virus 1 dual-target nucleic acid technology improves blood safety: 5 years of experience of the German Red Cross blood donor service Baden-Württemberg–Hessen. *Transfusion*. 2018; 58(12): 2886–2893, doi: [10.1111/trf.14919](https://doi.org/10.1111/trf.14919), indexed in Pubmed: [30325043](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30325043/).
74. AIDS PTN. Zasady opieki nad osobami zakażonymi HIV, 2019.
75. Ostrowska W, Kawecka M. Przetaczanie krwi i jej pochodnych. Przepisy dla szpitali, PZWL.
76. Postępowanie Zapobiegawcze i Diagnostyczne w Przypadku Zakażenia HIV i zachorowania na AIDS, wskazówki dla pracowników służby zdrowia (do użytku służbowego). PZWL, 1989.
77. Grabarczyk P, Kopacz A, Sulkowska E, et al. Badania wirusów przenoszonych przez krew u dawców krwi w Polsce. *Przeg Epidemiol*. 2015: 591–595.
78. Brojer E, Moraczewska-Głoskowska Z, Sankowska M. Badanie obecności materiału genetycznego wirusa HIV w mononuklearach dawców krwi z wątpliwymi wynikami testu Western-Blot. *Problemy HIV i AIDS*. 1995: 9–11.
79. Mikulska MS, Grabarczyk E, Medyńska P, et al. Częstość zakażeń wirusem HIV w populacji dawców w Polsce w latach 1988–2007. *J Transf Med*. 2008: 20–27.
80. Bruhn R, Lelie N, Custer B, et al. Prevalence of human immunodeficiency virus RNA and antibody in first-time, lapsed, and repeat blood donations across five international regions and relative efficacy of alternative screening scenerios. *Transfusion*. 2013: 2399–2412, doi: [10.1111/trf.12299](https://doi.org/10.1111/trf.12299), indexed in Pubmed: [23782054](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23782054/).