

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SANDRA BLAŠKO

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2016.

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SANDRA BLAŠKO

**PRIMERJAVA OKULTNE OKUŽBE Z VIRUSOM HEPATITISA B  
V POPULACIJAH KRVODAJALCEV V SLOVENIJI IN NA HRVAŠKEM**

**A COMPARISON OF OCCULT HEPATITIS B VIRUS INFECTION IN  
POPULATION OF VOLUNTARY BLOOD DONORS OF SLOVENIA AND  
CROATIA**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2016.

## **ZAHVALA**

Iskreno se zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Matjažu Jerasu, mag.farm. za vso pomoč in strokovne nasvete pri izdelavi magistrske naloge. Hvala za vse hitre odgovore, popravke in usmeritve pri delu.

Prav tako se najlepše zahvaljujem delovni mentorici doc. dr. sc. Ireni Jukić, dr. med., spec. transf. ki me je nesebično vzela pod svoje okrilje. Hvala za usmerjanje, spodbudo in številne uporabne nasvete.

Zahvaljujem se somentorici Snežni Levičnik Stezinar, dr. med., spec. transf. med. za pomoč in zbrane podatke bolnikov v ZTM.

Zahvaljujem se odvetnici Irmi Hrelja Csaszar za pomoč pri prevodu magistrske naloge. Velika zahvala gre tudi mojim staršem, sestri, fantu in prijateljem za spodbudo in razumevanje med pisanjem magistrske naloge in tekom študija. Še posebej bi se rada zahvalila mami za brezpogojno podporo, pomoč in nasvete tekom celotnega študija.

## **IZJAVA**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno, pod mentorstvom izr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag.farm. ter somentorstvom Snežne Levičnik Stezinar, dr. med., spec. transf. med. in delovnim mentorstvom doc. dr. sc. Irene Jukić, dr. med., spec. transf.

Ljubljana, 2016.

Sandra Blaško

---

Komisija za zagovor:

1. Predsednik: prof. dr. Janko Kos
2. Mentor: izr. prof. dr. Matjaž Jeras
3. Somentorica: Snežna Levičnik Stezinar dr. med., spec. transf. med.
4. Član: doc. dr. Žiga Jakopin

# VSEBINA

<b>POVZETEK</b> .....	VII
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	X
<b>I. UVOD</b> .....	1
1.1 VIRUS HEPATITISA B (HBV) .....	1
1.1.1 GENOM HBV .....	2
1.2 FAZE OKUŽBE S HBV .....	3
1.3 OKUŽBA S HBV IN HEPATOCELULARNI KARCINOM (HCC).....	6
1.4 TESTIRANJE NAT.....	7
1.4.1 DISKRIMINACIJSKI TESTI NAT (DHBV, DHCV, DHIV).....	9
1.5 OKULTNI HEPATITIS B (OBI) .....	9
1.5.1 OPREDELITEV OBI .....	9
1.5.2 UGOTAVLJANJE OBI.....	10
1.5.3 REAKTIVACIJA OBI.....	12
1.6 RAZLIČNE OBLIKE OBI.....	13
1.7 POSTOPKI VPOGLEDA NAZAJ (»LOOK-BACK«) IN IZSLEDITVE (»TRACE-BACK«) .....	14
1.7.1 POSTOPKI »LOOK-BACK« .....	14
1.7.2 POSTOPKI »TRACE-BACK«.....	15
1.8 PREVENTIVA IN ZDRAVLJENJE HEPATITISA B.....	15
1.8.1 PREVENTIVA OKUŽB S HBV .....	15
1.8.2 ZDRAVLJENJE.....	16
<b>II. NAMEN DELA</b> .....	17
<b>III. MATERIALI IN METODE</b> .....	18
3.1 VIRI PODATKOV .....	18
3.2 METODE, UPORABLJENE ZA TESTIRANJA NAT .....	18
3.3 STATISTIČNA OBDELAVA IN PREDSTAVITEV REZULTATOV .....	19
<b>IV. REZULTATI</b> .....	20

4.1 DAROVANJE KRVI .....	20
4.2 EPIDEMIOLOGIJA VIRUSNEGA HEPATITISA B .....	22
4.3 PRIMERJAVA SEROLOŠKEGA TESTIRANJA KRVODAJALCEV NA HBSAG V RS IN RH (2007 - 2015).....	23
4.4 PRIMERJAVA PODATKOV TESTIRANJA NAT OBI V RS IN RH.....	24
4.5 KRONOLOŠKA PRIMERJAVA PREVALENCE OKUŽBE S HBV PRI KRVODAJALCIH V RS IN RH .....	26
4.6 POSTOPKI VPOGLEDA NAZAJ (»LOOK BACK«).....	27
<b>V. RAZPRAVA .....</b>	<b>29</b>
<b>VI. SKLEP .....</b>	<b>33</b>
<b>VII. LITERATURA .....</b>	<b>34</b>
<b>VIII. PRILOGE .....</b>	<b>37</b>

#### **SEZNAM SLIK:**

Slika 1: Shematski prikaz zgradbe HBV

Slika 2: Shematski prikaz genoma virusa hepatitisa B (HBV)

Slika 3: Tipična slika serološkega poteka akutne okužbe s HBV

Slika 4: Serološki potek kronične okužbe s HBV

Slika 5: Shematski prikaz življenjskega cikla HBV

Slika 6: Povzetek potencialnih izvorov okultne okužbe z virusom hepatitisa B (OBI)

Slika 7: Izvajanje postopka »look-back«

#### **SEZNAM PREGLEDNIC:**

Preglednica I: Interpretacija rezultatov seroloških testiranj okužbe s HBV

Preglednica II: Ocena preostalega tveganja za prenos HBV s transfuzijami krvi v posameznih državah

Preglednica III: Ogrožene skupine bolnikov, ki so dovzetne za okultni hepatitis B

Preglednica IV: Prisotnost označevalcev okužbe s HBV v krvnih vzorcih DNA HBV pozitivnih krvodajalcev z OBI

Preglednica V: Izsledki serološkega testiranja krvodajalcev na HbsAg ter podatki o incidenci in prevalenci v RS in RH

Preglednica VI: Rezultati testiranj NAT na DNA HBV prostovoljnih krvodajalcev z OBI v RS (2007-2009) in RH (2013-2015)

## **SEZNAM GRAFOV:**

Graf 1: Primerjava prevalenc krvodajalcev z OBI, odkritih s testom NAT v treh letih od njegove uvedbe v RS (2007 - 2009) in RH (2013 – 2015).

Graf 2: Kronološka primerjava prevalenc okužbe s HBV v RS (modra krivulja) in RH (rdeča krivulja), v obdobju od 1998 - 2015.

## **ENAČBE:**

Enačba 1: Izračun preostalega tveganja za pojav potransfuzijskega hepatitisa

## **SEZNAM PRILOG:**

Priloga 1: Algoritmi NAT presejalnega testiranja v RS in RH

Priloga 2: Algoritem evalvacije krvodajalcev z reaktivnostjo HBV-NAT in / ali HbsAg test

## ***POVZETEK***

Kronična oblika hepatitisa B predstavlja velik zdravstveni problem zaradi kroničnih nosilcev virusa HBV, ki ga lahko še leta po okužbi prenesejo na druge osebe, ter seveda zaradi možnosti nastanka ciroze jeter, jetrne insuficience ter hepatocelularnega karcinoma. Najboljši način za preprečevanje prenosa je cepljenje, ki je sedaj obvezno za novorojenčke, adolescente in rizične skupine prebivalstva. Med okultno okužbo s HBV (OBI) se virus replicira, vendar v krvi okuženih ne zaznamo HbsAg, osnovnega biološkega označevalca virusa. Sicer pa v njihovi krvi v nizkih koncentracijah sočasno zasledimo virusno DNA, in protitelesa proti jedrnemu antigenu (anti-HBc), ki jih lahko spremlja prisotnost ali odsotnost drugih protiteles. Okultna okužba s HBV je večinoma asimptomatična, zato je zelo pomembno, da jo odkrijemo predvsem v krvi krvodajalcev in darovalcev organov in tkiv, saj so virusi zelo nevarni za imunsko kompromitirane prejemnike.

Za odkrivanje OBI pri krvodajalcih uporabljamo metodo za dokazovanje prisotnosti virusnih nukleinskih kislin NAT (Nucleid Acid amplification Technology). Na ta način lahko odkrijemo tudi akutne virusne okužbe znotraj 'diagnostičnega okna' ter tako izboljšujemo varnost pri oskrbi s krvjo. Republika Slovenija (RS) je testiranje NAT za HBV uvedla leta 2007, Republika Hrvaška (RH) pa leta 2013. Kadar ugotovimo, da je krvodajalec, ki je predhodno že daroval kri, okužen in bi zato lahko škodoval zdravju prejemnikov njegove krvi, se izvede tako imenovani postopek pogleda nazaj (ang. look-back procedure).

V magistrski nalogi smo opisali in primerjali sistema darovanja krvi ter epidemiologijo hepatitisa B v RS in RH. Ugotovili smo, da je v obeh državah opazen padec števila primerov akutnega hepatitisa B in kroničnih prenašalcev HBV. Pri primerjavi serološkega testiranja HbsAg, ki je bilo v rabi pred uvedbo metode NAT, smo ugotovili, da je bilo to, zaradi zelo podobnih socialno-ekonomskih in epidemioloških situacij, v obeh državah uvedeno v približno enakem času. S kronološko primerjavo rezultatov serološkega testiranja pa smo prišli do ugotovitve, da je bila v 90-ih letih prevalenca hepatitisa B v obeh državah večja kot danes in to predvsem zaradi prihoda velikega števila beguncev s področja Bosne in Hercegovine (BiH), še posebej v RH. Danes je zaradi obveznega cepljenja in testiranja NAT in povratka beguncev prevalenca hepatitisa B dosti nižja. Primerjava rezultatov testiranja NAT v prvem letu po njegovi uvedbi v posamezni državi je pokazala, da je bila prevalenca OBI v tem časovnem okviru zelo visoka, kar je seveda razumljivo, saj je bilo v predhodnih letih dostopno le

serološko testiranje oz. določanje specifičnih protivirusnih protiteles, s katerimi ni bilo mogoče odkriti OBI. Postopno se torej prevalenca okultne okužbe krvodajalcev s HBV zmanjšuje, z uvedbo obveznega testiranja NAT vseh krvodajalcev pa smo dobili varnejšo kri, namenjeno terapevtskim transfuzijam.

**Ključne besede:** transfuzija, virus hepatitisa B, okultni hepatitis B, testiranje NAT, postopki »look-back«, cepljenje



# ABSTRACT

The chronic form of hepatitis B is a major health problem because of chronic HBV carriers who years later can transmit the virus to other people and because of the potential progression to liver cirrhosis, liver failure and hepatocellular carcinoma. The best method of prevention is vaccination, which is obligatory for newborn children, adolescents and risk groups. Occult HBV infection is a condition in which the virus replicates, however no basic HBV markers, HBsAg, are present in the blood of the infected person. HBV DNA is present at low concentrations with the simultaneous presence of anti-HBc and other present or absent antibody. Occult HBV infection is mostly asymptomatic and it is very important to reveal it in the blood, organ and tissue donors that are dangerous for immunocompromised recipients.

For the detection of occult HBV infection (OBI) we are currently using the method for the detection of nucleic acid NAT (Nucleic Acid amplification Technology) for testing voluntary blood donors. NAT can detect an acute viral infection during the 'window period', which was not detected by the serological screening and thus can improve the safety of the blood supply. In 2007 Slovenia introduced NAT testing for HBV, while Croatia introduced it in 2013. Look-back procedure must be performed if a donor who has already donated blood is infected and could harm the health of the recipient's blood.

In this thesis, we describe and compare the system of blood donation, the epidemiology of hepatitis B in the Republic of Slovenia and the Republic of Croatia where a fall of acute hepatitis B and chronic carrier state has been observed. Comparing the serological testing HBsAg we noticed equal time of introduction, as a consequence of the same socio-economic and epidemiological situation. By the chronological comparing of serological testing, we conclude that in the 1990s the prevalence of hepatitis B was higher than it is today because of the arrival of refugees from Bosnia and Herzegovina, especially in Croatia. Today, due to the introduction of mandatory vaccination and the introduction of NAT testing for testing voluntary blood donors, the prevalence of hepatitis B is significantly lower.

By comparing the NAT testing data in the first year of the introduction of testing in both two countries, we detected a very high prevalence of OBI. The reason is that in the previous years only serological tests were available, which do not reveal the existence of OBI. Gradually,

the prevalence of occult HBV infection decreases, so we can conclude that because of introduction of NAT testing for testing voluntary blood donors we have safer blood transfusion.

**Key words:** transfusion, hepatitis B virus, occult hepatitis B, NAT testing, look-back procedures, vaccination

## ***SEZNAM OKRAJŠAV***

ALT- alaninska aminotransferaza

anti-HBc- protitelesa proti jedrnim antigenom virusa hepatitisa B (ang. c – core)

(kombinacija protiteles IgG in IgM, ki označuje okužbo s HBV v preteklosti)

anti-Hbe – protitelesa proti ovojnici HBV (ang. e – envelope) [ta protitelesa se pojavijo med procesom serokonverzije, ko antigeni virusne ovojnice izginejo, njihova prisotnost pa označuje tudi izginotje DNA HBV iz seruma in remisijo jetrne bolezni]

anti-HBs- protitelesa proti površinskim antigenom HBV (ang. s – surface) [nevtralizirajoča protitelesa, ki označujejo okrevanje ali reakcijo na imunizacijo]

AST- aspartatna aminotransferaza

DNA- deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic Acid)

EIA- encimsko imunski test (ang. enzyme immunoassay)

HBcAg- antigenski protein jedrne ovojnice HBV (ang. core antigen)

HBeAg- antigenski protein, zunajcelična oblika HBcAg, ki kaže na aktivno delitev HBV

HBIg- protitelesa (imunoglobulini) proti HBV

HBsAg- površinski antigenski proteini HBV (ang. surface antigen)

HBV-virus hepatitisa B

HCC- hepatocelularni karcinom (ang. hepatocellular carcinoma)

HCV- virus hepatitisa C

HIV- virus človeške imunske pomanjkljivosti (ang. human immunodeficiency virus)

HZTM- Hrvatski zavod za transfuzijsko medicino (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu)

NAT- testiranje na prisotnost virusnih nukleinskih kislin (ang. nucleic acid amplification technology)

NK- nukleinska kislina

NKT celice- naravne celice T ubijalke

OBI- okultna okužba s HBV (ang. occult hepatitis B virus infection)

PK- prostovoljni krvodajalec

rtPCR- verižna reakcija s polimerazo v realnem času (ang. real time polymerase chain reaction)

RH- Republika Hrvaška

RR- ponovljeno reaktiven vzorec (ang. repeatedly reactive)

RS- Republika Slovenija

TMA- transkripcijska amplifikacija (ang.transcription mediated amplification)

TTI- okužba prenesena s transfuzijo (ang.transfusion transmitted infection)

VL- virusno breme, količina virusa (ang. viral load)

WHO- svetovna zdravstvena organizacija (ang. world health organization)

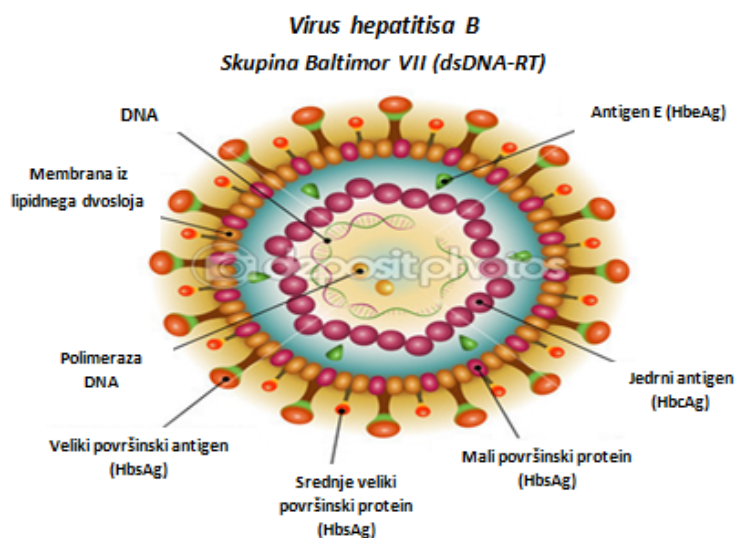
ZTM- Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

# I. UVOD

## 1.1 VIRUS HEPATITISA B (HBV)

Virus hepatitisa B (HBV) povzroča akutni hepatitis, lahko pa izzove tudi kronično obliko te bolezni. Večina novih okužb je posledica prenosa HBV z matere na otroka. V Severni Ameriki in Evropi je prevalenca okužbe 0,5%. Vzroki zanjo pri odraslih so večinoma intravensko jemanje drog in nezaščiteni spolni odnosi. Okužba s HBV v odrasli dobi privede do nastanka kroničnega hepatitisa samo v 1 do 5% primerov, pri otrocih pa kar v 95% primerov. Imunizacija proti HBV je uspešna pri 90% odraslih in 95% otrok, cepljenim osebam pa zagotavlja doživljenjsko imunost.

Virus hepatitisa B vsebuje majhno krožno DNA, uvrščamo pa ga v razred *Hepadnavirusov* (Slika 1).



**Slika1:** Shematski prikaz zgradbe HBV; prirejeno po (16).

Virus se ne širi fekalno-oralno. Hepatocitov po okužbi ne uniči neposredno, pač pa je to posledica imunskega odziva. Pri 90% bolnikov mine akutna okužba s HBV brez zapletov, pri 0,1 do 1% pa pride do akutne odpovedi jeter. Inkubacijska doba po okužbi traja od enega do štiri mesece, temu pa sledi prodromalna faza z nespecifičnimi gastrointestinalnimi simptomi. Nato sledi obdobje atipičnih simptomov, kot so slabost, utrujenost, anoreksija, bruhanje in

bolečine pod desnim rebrom. Ko ti simptomi izzvenijo, se pojavi zlatenica, ki traja od enega do treh mesecev. Kronični hepatitis je posledica okužbe s HBV, ki traja več kot šest mesecev. Pri tovrstnih bolnikih se lahko razvije ciroza, nagnjeni pa so tudi k nastanku hepatocelularnega karcinoma (HCC) (1).

Diagnoza okužbe s HBV vključuje biokemijska, serološka in virološka testiranja. Med biokemičnimi preiskavami je najpomembnejše določanje jetrnih aminotransferaz ALT in AST v serumu). Virološke preiskave vključujejo serološke teste kvalitativnega in kvantitativnega določanja antigenov HBV in protiteles, ki jih prepoznavajo, ter seveda merjenje koncentracij virusne DNA (2).

Cepljenje proti hepatitisu B zelo učinkovito preprečuje (>95% učinkovitosti) obolevnost in smrtnost zaradi okužb s HBV (3, 4). Leta 2006 je Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) evidentirala že 161 držav, ki izvajajo obvezno cepljenje. Kljub temu pa se naravni rezervoar HBV ne zmanjšuje proporcionalno. Vzrok za to je dejstvo, da živi na področjih z visoko endemičnostjo okužb kar 45% svetovne populacije, pri čemer v teh okoljih preventivnih ukrepov zaradi različnih vzrokov ne morejo izvajati v celoti (3). Zdravljenje okužbe s HBV se še vedno izvaja v kronični in ne v akutni fazi bolezni, njegova tarča pa je virusna polimeraza in s tem zaustavljanje replikacije virusa. Odziv bolnikov na terapijo variira in je odvisen od genotipa in podtipa virusa, s katerim je bolnik okužen.

### **1.1.1 GENOM HBV**

Virion HBV ali Dane-ovo telesce ima premer 42 nm. Obdan je z zunanjo lipoproteinsko ovojnico in vsebuje virusno nukleokapsido ali jedro (ang. core), sestavljeno iz virusne DNA, HBcAg, polimeraze/reverzne transkriptaze DNA, proteinske kinaze in HbeAg (Slika 1). Poleg virionov so v serumu in hepatocitih okuženih oseb prisotne tudi velike količine subvirusnih delcev. Ti sicer niso infektivni, saj ne vsebujejo virusne DNA, so pa zato izrazito imunogeni in povzročajo nastajanje niza nevtralizirajočih protiteles, zato jih izkoriščajo pri načrtovanju in izdelavi cepiv.

Virusni genom tvori majhna krožna molekula DNA, ki vsebuje štiri gene (približno 3.200 baznih parov) z delno prekrivajočimi se bralnimi okvirji (ORF). Ti kodirajo proteinske polimeraze (gen P), tri površinske proteine (gen pre-S/S), proteinski ovoj nukleokapside (gen pre-C/C) in X-protein (gen X) (Slika 2).

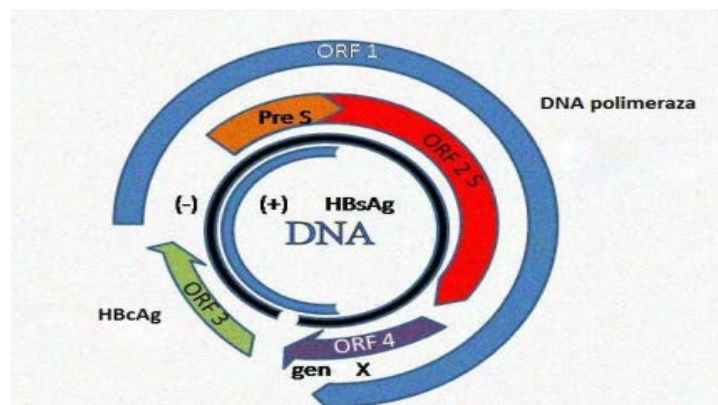
Gen pre-S/S kodira tri virusne površinske proteine, in sicer S, pre-S1 ali L-protein ter pre-S2 ali M-protein. Funkcije proteina M (pre-S2) ne poznamo, L-protein (pre-S1) pa ima ključno

vlogo pri vezavi virusa na celične receptorje gostitelja, razgradnji virionov in sprostitvi njihove vsebine v notrajnost okuženih celice. Vzpostavljen celični in humoralni oz. protitelesni imunski odziv na HBsAg nas ščiti pred okužbo s HBV. Danes kot cepivo najpogosteje uporabljamo rekombinantni HBsAg.

Gen pre-C/C kodira antigen nukleokapside virusnega jedra (HBcAg) in protein pre-C. Slednji se posttranslacijsko modificira v protein HBeAg (16 kDa). Ko so peptidi HBcAg izpostavljeni na površini hepatocitov, inducirajo celični imunski odziv, ki je ključen za učinkovito odstranjevanje okuženih celic (32).

Področje P v virusnem genomu kodira polimerazo DNA (P). Ta ima hkrati vlogo reverzne transkriptaze (RT), ki je potrebna za sintezo komplementarne DNA iz matrične RNA. Polimeraza vsebuje aminokislinsko zaporedje YMDD (tirozin, metionin, aspartat, aspartat), ki je nujno za povezovanje nukleozidov, mutacije v tem področju pa imajo velik terapevtski potencial.

Genomsko področje X kodira X-protein (HBx), ki modulira transdukcijske signale v celici gostitelja in je aktivator transkripcije virusnega genoma. Potreben je za replikacijo HBV *in vivo* in za njegovo širjenje. Predpostavljajo, da je vpleten v razvoj HCC (32).

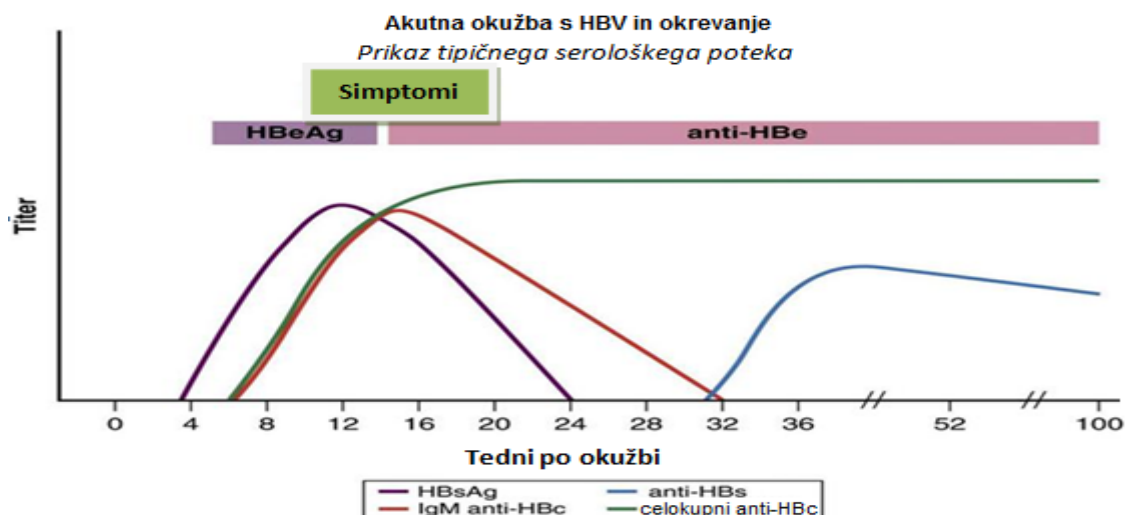


**Slika 2:** Shematski prikaz genoma virusa hepatitisa B (HBV); prirejeno po (32).

## 1.2 FAZE OKUŽBE S HBV

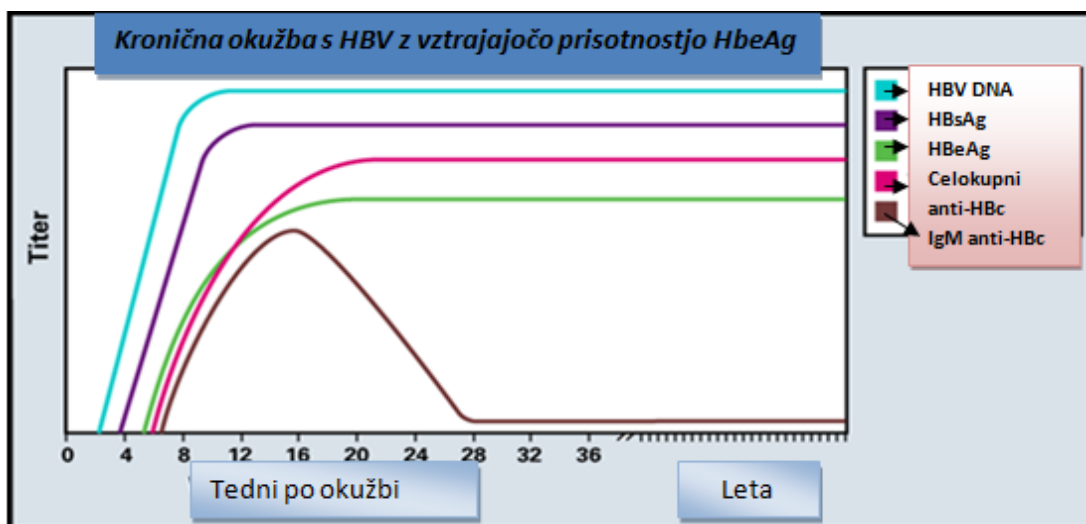
Po preteku inkubacijske dobe se začne akutna okužba s HBV. Simptome akutnega hepatitisa ima pri odraslih osebah 30 do 50% okuženih, pri katerih je, tako kot pri tistih z asimptomatsko okužbo, rezultat okužbe samo omejeni hepatitis in trajna odstranitev virusa. V krvi so na začetku okužbe prisotne molekule HBsAg, ki so izražene na virusni ovojnici, kmalu za tem pa še HBeAg, ki izvirajo iz notranjosti virusa. Obe vrsti antigenov aktivirata imunski odziv, ta pa

deluje citotoksično na okužene hepatocite, posledica česar je tudi povečano izločanje jetrnih encimov. Nato se začne proizvodnja protiteles razreda IgM, ki prepoznavajo jedrni antigen (anti-HBcAg). HBcAg je označevalec aktivne okužbe. Po nekaj tednih omenjena protitelesa zamenjajo protitelesa razreda IgG anti-HBc, kar je znak uspešno prebolele bolezni. Po šestih mesecih od okužbe pa so v krvi prisotna protitelesa IgG anti-HBsAg, kar je znak da je oseba imunizirana in zaščitena pred morebitno ponovno okužbo s HBV (6).



**Slika 3:** Tipična slika serološkega poteka akutne okužbe s HBV; prirejeno po (17).

Akutna okužba s HBV se le v redkih primerih razvije v kronično. To se zgodi takrat, ko nastala protitelesa ne zadoščajo za popolno nevtralizacijo virusa. Osebe z vztrajajočo okužbo s HBV, brez znakov jetrne bolezni, so asimptomatski nosilci virusa, ki jih odkrijemo naključno, najpogosteje z nediagnostičnim testiranjem krvi na označevalce HBV. Za take osebe so značilni: spremenjena histologija jetrnega parenhima in biokemični kazalniki vnetja jeter.



**Slika 4:** Serološki potek kronične okužbe s HBV; prirejeno po (18).

Kronično okužbo potrdimo, ko v krvi, šest mesecev po začetni okužbi, odkrijemo HBsAg. Ponovni, akutni izbruh okužbe pa lahko ugotovimo z določanjem HbcAg, ki je, kot smo že omenili, prisoten le med aktivno virusno replikacijo. Zelo pomembno pa je, da je virusna DNA v krvi okuženih prisotna ves čas (6).

Potek kronične HBV okužbe lahko opišemo s pomočjo štirih faz, in sicer s: fazo imunske tolerance, fazo imunske odstranitve, inaktivno fazo in fazo reaktivacije. Faza imunske tolerance je značilna za osebe, ki so se okužile perinatalno. Topne molekule HBeAg matere namreč prehajajo placento in v plodu oz. otroku izzovejo imunsko toleranco nanje, ki lahko traja tudi do 20 let. Za to fazo so značilni: odsotnost simptomov, visok virusni titer v krvi (>10<sup>6</sup>/mL), antigenemija HBe, normalna aktivnost jetrnih encimov, minimalna vnetna aktivnost in ekspresija HBcAg (5). Fazi imunske tolerance sledita faza imunske eliminacije in inaktivna faza. Inaktivna faza je vsekakor prelomnica v kliničnem poteku kronične okužbe. Serokonverzija HBe, torej pojav protiteles proti HBeAg, ki ji sledi zmanjšana replikacija virusa, je uvod v inaktivno fazo kronične okužbe s HBV, za katero sta značilni biokemijska in histološka regresija bolezni (7).

Preglednica I. Interpretacija rezultatov seroloških testiranj okužbe s HBV; prirejeno po (19)

<u>OZNAČEVALCI</u>	<u>TEST</u>	<u>STATUS BOLNIKA</u>	<u>OZNAČEVALCI</u>	<u>TEST</u>	<u>STATUS BOLNIKA</u>
HbsAg Protitelesa anti-HBc Protitelesa anti-HBs	Negativen Negativen Negativen	Dojmljiv za okužbo s HBV	HbsAg Protitelesa anti-HBc Protitelesa IgM anti-HBc Protitelesa anti-HBs	Pozitiven Pozitiven Negativen Negativen	Kronična okužba s HBV
HbsAg Protitelesa anti-HBc Protitelesa anti-HBs	Negativen Pozitiven Pozitiven	Imun po okužbi s HBV	HbsAg Protitelesa anti-HBc Protitelesa anti-HBs	Negativen Pozitiven Negativen	Nejasna interpretacija; štiri možnosti: 1. Okužba odstranjena (najpogosteje) 2. Lažno pozitiven test na protitelesa anti-HBc, zato dojmljiv za okužbo 3. Šibko izražena kronična okužba 4. Akutna okužba med procesom ozdravitve
HbsAg Protitelesa anti-HBc Protitelesa anti-HBs	Negativen Negativen Pozitiven	Imun po cepljenju proti HBV			
HbsAg Protitelesa anti-HBc Protitelesa IgM anti-HBc Protitelesa anti-HBs	Pozitiven Pozitiven Pozitiven Negativen	Akutna okužba s HBV			



Površinski antigen HBV (HBsAg) določamo za potrjevanje akutne okužbe in ugotavljanje prenašalcev HBV, njegova prisotnost po več kot šestih mesecih od okužbe pa kaže na kronično obliko bolezni. V vsakem primeru pa je HBsAg značilen za osebe, ki so infektivne.

Protitelesa proti površinskim antigenom HBV (anti-HBs) so nevtralizirajoča in so bodisi znak okrevanja ali pa uspešne imunizacije. Prisotnost protiteles anti-HBs in sočasna odsotnost drugih seroloških označevalcev je značilnost oseb imuniziranih s cepivom.

Protitelesa proti jedrnemu antigenu (anti-HBc) so mešanica molekul IgG in IgM in označujejo okužbe s HBV v preteklosti. Medtem ko protitelesa razreda IgG ostanejo v posamezniku celo življenje in niso znak akutne okužbe, razvijejo pa se tudi pri osebah, imuniziranih s cepivom, pa so protitelesa IgM anti-HBc prisotna pri akutni okužbi in običajno izginejo nekaj tednov po njenem začetku (Preglednica I).

Antigen ovojnice HBV, HBeAg, je označevalec virusne replikacije in infektivnosti. Protitelesa, ki ga specifično prepoznavajo (anti-HBe), so prisotna takrat, ko HBeAg izgine iz krvi, kar označujemo z izrazom serokonverzija.

Za detekcijo okužbe s HBV uporabljamo tudi zaznavanje virusne DNA. Njena prisotnost namreč kaže na replikacijo virusa in infektivnost bolnika. Določamo jo z molekularno-biološkimi metodami, natančneje s testi NAT. Rezultati določanja virusnega titra pa se uporabljajo za izbiro načina zdravljenja okužbe in za spremljanje njegove učinkovitosti (8).

### ***1.3 OKUŽBA S HBV IN HEPATOCELULARNI KARCINOM (HCC)***

Napredovanje bolezni v cirozo in HCC je vezana na različne dejavnike: čas trajanje okužbe, kronično nosilstvo virusa, spol, virusni genotip, sočasno okuženost z virusom HCV ali HIV, aktivnost ALT, obsežnost fibroze in najpomembnejšega od vseh, virusno obremenitev (VL). Bolniki z vrednostmi VL >10<sup>4</sup> kopij DNA/mL imajo povečano tveganje za razvoj HCC (9). Trideset odstotkov bolnikov s cirozo je HbeAg-ali HBV DNA-pozitivnih. Pri 15 - 20% tovrstnih bolnikov se znotraj obdobja petih let razvijejo dekompenzirana jetra (letno 3 - 6%), po petletnem preživetju pa pri nadaljnih 30 - 50%. Petletno preživetje bolnikov z dekompenziranimi jetri je 80 - 85%. Primarni HCC nastane po dolgotrajnem kroničnem vnetju jeter, tekom katerega pride do progresivne akumulacije različnih genskih sprememb. Za razliko od HCC, ki ga povzroči HCV in se lahko razvije le v pogojih jetrne ciroze, HBV z integracijo svoje DNA v celični genom to bolezen lahko izzove neodvisno od ciroze. Zato je zelo pomembno, da bolnika tekom kroničnega nosilstva virusa redno testiramo na tumorske

označevalce (10). Hepatocelularni karcinom so dokazali tudi pri osebah z okultno okužbo s HBV. S HBV povzročeni HCC je smrten, saj le 3% bolnikov s to diagnozo brez ustrezne terapije živi dlje kot pet let. Smrt nastopi zaradi odpovedi jetrne funkcije, ki je posledica hitre rasti tumorja in ciroze, prisotna pa je pri kar 90% obolelih.

## 1.4 TESTIRANJE NAT

Cilj oskrbe s krvjo je zagotoviti varno kri za bolnike, ki jo potrebujejo. Čeprav transfuzija krvi še nikoli ni bila bolj varna kot je danes, pa kljub temu ostaja to področje eden od glavnih javno zdravstvenih problemov, ki zahteva kontinuirano prizadevanje, da bi se približali ničelnemu tveganju za prenos okužb. To dosegamo z vse občutljivejšimi molekularno biološkimi testiranjem, izboljšanimi serološkimi testi in tehnologijo virusne inaktivacije v krvnih pripravkih (12). Trenutno izvajamo serološko testiranje z encimsko-imunosko metodo (EIA), neposredno prisotnosti virusov pa ugotavljamo bodisi s transkripcijsko posredovano amplifikacijo (TMA), ki je novejša metoda NAT, ali pa z verižno reakcijo s polimerazo DNA v realnem času (RT-PCR).

Najnovejši specifičen način ugotavljanja prisotnosti virusov HCV, HIV in HBV v krvi krvodajalcev je določanje njihovih nukleinskih kislin z metodami NAT (Nucleid Acid amplification Technology). Z uporabo metode NAT lahko tekom diagnostičnega okna odkrijemo zgodnje akutne virusne okužbe, ki jih ne moremo zaznati s serološkim presejalnim testiranjem. Ciljno sekvenco, in sicer od 10 do 100 baznih parov virusnih DNA ali RNA, s pomočjo ustreznih encimov pomnožimo tolikokrat, da jih nato lahko zaznamo z različnimi, zelo občutljivimi metodami detekcije. Izbrani ciljni fragmenti virusnih nukleinskih kislin so izbrani tako, da so zelo specifični, saj se ne pojavljajo v genomih drugih organizmov (12). Glavni cilj uvedbe NAT v presejalno testiranje krvi prostovoljnih krvodajalcev je bil zmanjšati preostalo tveganje glede transfuzije krvi, okužene z virusom, ki je povezano z diagnostičnim oknom. Diagnostično okno je čas med okužbo in sposobnostjo ugotovitve njene prisotnosti s pomočjo različnih laboratorijskih metod. Preostalo tveganje za prenos HBV se torej nanaša na obdobje pred serokonverzijo diagnostičnega okna ali pa na okultno okužbo s HBV (OBI) (4).

$$\text{PREOSTALO TVEGANJE} = \frac{\text{incidenčna stopnja}}{\text{diagnostično okno}} = \frac{\frac{\text{število potrjeno pozitivnih}}{\text{število testiranih oseb na leto}}}{\text{diagnostično okno za posamezen označevalec v dnevih}}$$

**Enačba 1:** Izračun preostalega tveganja za pojav potransfuzijskega hepatitisa; povzeto po

(21).

Za točen izračun preostalega tveganja (Enačba 1) moramo upoštevati korekcijske faktorje, ki vplivajo na matematični model. Najpomembnejši kriteriji so: točnost in zanesljivost podatkov o prevalenci in incidenci okužbe med krvodajalci in v splošni populaciji, točnost izračuna diagnostičnega okna, upoštevanje lastnosti krvodajalcev (novi, redni, pogostost dajanja krvi), občutljivost uporabljene laboratorijske metode, izbrano časovno obdobje, upoštevanje morebitnih napak narejenih v okviru raziskav (21).

Diagnostično okno je odvisno od povzročitelja okužbe, gostitelja ter vrste označevalca in diagnostične metode, ki jo uporabljamo za njegovo določanje. V primerjavi s serološkimi testi, določanje prisotnosti DNA HBV z metodo NAT pri presejalnem testiranju krvodajalcev zmanjšuje čas diagnostičnega okna ter tako omogoča odkrivanje OBI. Testiranje NAT na HCV se v severnih evropskih državah uporablja pet do šest krat manj pogosto kot v mediteranskih, kar je posledica dejstva, da je pogostost okužbe s HCV geografsko pogojena (na severu bistveno manjša kot na jugu). Stopnje tveganja za prenos HBV s transfuzijami krvi v posameznih državah so prikazane v Preglednici II.

Preglednica II. Ocena preostalega tveganja za prenos HBV s transfuzijami krvi v posameznih državah; povzeto po (21).

	Francija	Španija	Italija	Avstralija	ZDA	Kanada
Preostalo tveganje pred uvedbo NAT	2,1	13,5	15,8	1,9	14,9-15,8	12,0
Ocenjeno tveganje po uvedbi NAT	1,8	7,8	9,36	1,5	4,0-9,1	0,8
Opomba: Tveganje, ocenjeno na 10 <sup>6</sup> donacij.						

Presejalno testiranje NAT krvodajalcev se izvaja bodisi s posameznimi (testiranje vsakega posameznega krvodajalca oz. testiranje ID-NAT) ali z zlitimi/pomešanimi vzorci omejenega števila preiskovancev (zliti vzorci 6 - 8 krvodajalcev; mini pool oz. MP-NAT).

V RS so testiranje krvodajalcev na prisotnost HCV, HBV in HIV uvedli že leta 2007, na Hrvaškem pa 2013, pri čemer v obeh državah testirajo posamične vzorce krvodajalcev (ID-NAT). Postopek testiranja temelji na kemiluminiscenčnih testih TMA, in sicer Procleix<sup>®</sup>

Ultrio Plus™ Assay in Procleix® Elite™ Assay (Hologic, Grifols), ki jih izvajajo na popolnoma avtomatiziranih sistemih Procleix® Tigris ali Panther. Njuna specifičnost za HBV je 99,9% oz. 99,8%, klinična občutljivost pa 5 IU DNA /mL (11). Tako visoka občutljivost znatno zoži diagnostično okno (12, 13).

#### **1.4.1 DISKRIMINACIJSKI TESTI NAT (DHBV, DHCV, DHIV)**

Diskriminacijski testi NAT so del multipleksnega oz. trojnega (HBV, HCV in HIV) kemiluminiscenčnega testa TMA. V primeru njegovega potrjenega pozitivnega rezultata, z uporabo specifičnih oligonukleotidnih začetnikov (ang. primers) za podvajanje izbranih sekvenc posameznega virusnega genoma, določimo, kateri od treh virusov je izzval omenjeno reaktivnosti trojnega testa ID-NAT. Pri tem uporabljamo enako tehnologijo kot pri testu ID-NAT. V primerih, ko s ponavljanjem testa ID-NAT v triplikatu dobimo pozitiven rezultat, pri čemer mora biti vsaj 1/3 ponovljenih meritev pozitivnih (RR; ang. repeatedly reactive), izvedemo diskriminacijsko testiranje, krvodajalec pa ne sme več darovati krvi. Nato ga povabimo na potrdilno kontrolno testiranje, in sicer neodvisno od rezultatov serološkega testa na prisotnost protiteles anti-HBc in izidov diskriminacijskega testa NAT. V Prilogi 1 sta prikazana algoritma presejalnega testiranja in potrdilnega testiranja NAT na prisotnost nukleinskih kislin HBV, HCV in HIV-1, ki sta v uporabi v RS in RH, v Prilogi 2 pa algoritem evalvacije krvodajalcev s pozitivnim testom HBV-NAT in/ali pozitivnim testom na HBsAg, ki se izvaja v RH (20).

### **1.5 OKULTNI HEPATITIS B (OBI)**

#### **1.5.1 OPREDELITEV OBI**

Z uporabo novih diagnostičnih testov in uvajanjem molekularno-bioloških metod v testiranje zdravih oseb, med katere sodijo tudi krvodajalci so definirali še dve klinično pomembni stanji, in sicer okultni hepatitis B (OBI) in hepatitis B, ki nastane po endogeni reaktivaciji latentnega virusa. Obe sta zelo nevarni za imunsko kompromitirane bolnike. Pogostost okultne okužbe s HBV v splošni populaciji ni poznana, je pa povezana z mutacijo virusa (13). Pri osebah, okuženih s HBV, je lahko okužba simptomatska, asimptomatska ali prikrita zaradi imunosupresivne terapije. Za okultni hepatitis B (OBI) je značilno, da se virus HBV sicer replicira, vendar pri tem v krvi okuženih ne zaznamo serološkega označevalca HBsAg.

Virusna obremenitev (VL) oz. virusni titer je pri tovrstnih bolnikih najpogosteje nižji od 100, včasih pa dosega celo vrednosti od 1 do 10 IU kopij DNA HBV/mL.

Za pojav OBI menijo, da je pretežno odgovoren strog nadzor virusne replikacije oz. njene inhibicije, in ne genomske mutacije, ki bi imele za posledico konformacijske spremembe proteinov S (22). S preučevanjem T-celičnega odziva pri anti-HBc pozitivnih in negativnih bolnikih z OBI, so ugotovili, da je ta pri prvih (anti-HBc) enak tistemu, ki ga zaznamo v primerih premagane okužbe in vzpostavljenega imunskega nadzora HBV. Nasprotno pa pri bolnikih z OBI, ki nimajo protiteles anti-HBc, tovrstnega odziva limfocitov T niso dokazali (14). Eden od vzrokov za to bi lahko bil majhen obseg virusne replikacije in posledično nezadostna količina prisotnega HBcAg.

### 1.5.2 UGOTAVLJANJE OBI

Okultno okužbo s HBV, pri kateri so prisotna zaščitna protitelesa anti-HBs, v glavnem obravnavajo kot neinfektivno. Tiste osebe z OBI, ki imajo v krvi prisotna samo protitelesa anti-HBc, brez anti-HBs, pa so rahlo infektivne (11).

Okultna okužba s HBV je prisotna pri številnih pacientih okuženih z HCV in/ali HIV, s HCC in fibrozo jeter (Preglednica III) (27).

<b>Klinično ogrožene skupine za okultni hepatitis B</b>	
<b>Klinična skupina</b>	<b>Prevalenca OBI</b>
Kronična okužba s HCV s hepatocelularnim rakom	Visoka
Prejemniki jeter HBV-pozitivnih darovalcev	Visoka
Kronični hepatitis C s prisotnimi protitelesi anti-HBc	Zmerna
Kriptogena ciroza jeter	Zmerna
Intravenski uživalci drog	Zmerna
Redni krvodajalci	Nizka

**Preglednica III:** Ogrožene skupine bolnikov, ki so dovzetne za okultni hepatitis B (27).

\* visoka prevalenca >50%, zmerna 10 - 49% in nizka <10%.

Z ozirom na to, da je količina DNA HBV v krvnih vzorcih oseb z OBI zelo nizka, je njihovo odkrivanje odvisno od občutljivosti in specifičnosti uporabljenih testov. Kadar je DNA HBV

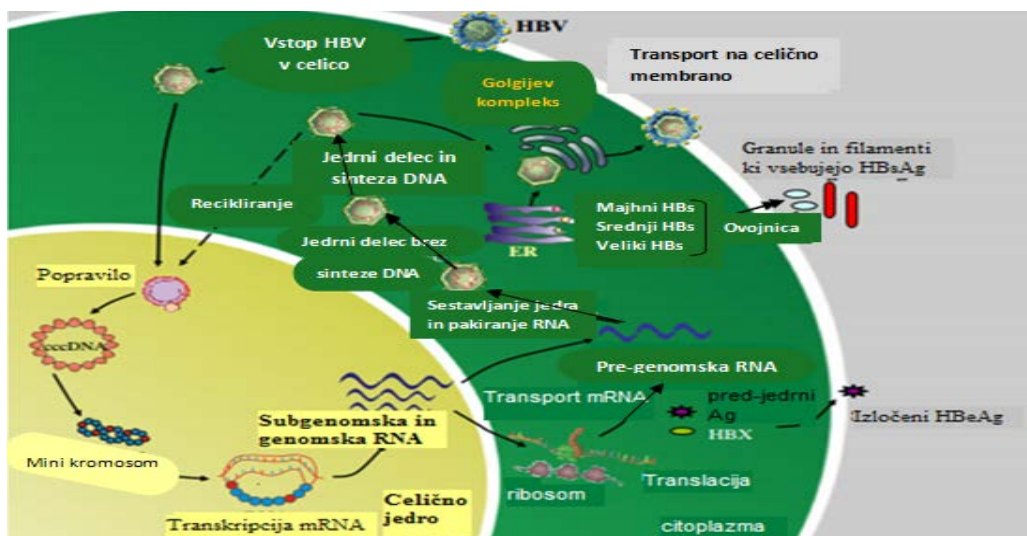
prisotna v izjemno majhnih (nezaznavnih) količinah v serumu, jo pogosto lahko zaznamo v jetrnem tkivu. Tiste osebe, ki nimajo izražene DNA HBV v jetrih, pa je tudi nimajo v serumu. Preglednica IV prikazuje povzetek rezultatov testiranja 29 DNA HBV pozitivnih krvodajalcev na serološke označevalce okužbe. Rezultati omenjenega testiranja so pri 28 vzorcih pokazali, da gre za OBI, saj so v njih potrdili prisotnost anti-HBc ter sočasno odsotnost ali prisotnost ostalih protiteles. Preostali vzorec pa predstavlja donacijo v času drugega diagnostičnega okna, in sicer zaradi sočasne prisotnosti IgM anti-HBc in protiteles anti-HBe. Reaktivacijski hepatitis se pojavlja pri osebah s prebolelo ali okultno okužbo s HBV, in sicer po končanju izrazite in dolgotrajne imunosupresije. Hepatitis nastopi potem, ko imunosupresivno terapijo prekinemo, pokaže pa se z naglim porastom količine HBV-DNA v krvi (10x) (23).

**Preglednica IV:** Prisotnost označevalcev okužbe s HBV v krvnih vzorcih DNA HBV pozitivnih krvodajalcev z OBI; povzeto po (11).

Presejalno testiranje		Dodatno testiranje					ŠTEVILO (DELEŽ)
HBsAg	HBV DNA	anti-HBc	IgM anti-HBc	HBeAg	anti-HBe	anti-HBs	
-	+	+	-	-	-	-	15 (51,80 %)
-	+	+	-	+	-	-	0 (0)
-	+	+	-	-	+	-	3 (10,30 %)
-	+	+	-	-	-	+	7 (24,10 %)
-	+	+	-	-	+	+	3 (10,30 %)
-	+	+	+	-	+	-	1 (3,50 %)
Skupaj:							29 (100,00 %)

Pri analizi prikazanih rezultatov presejalnih testiranj DNA HBV pozitivnih krvodajalcev so torej odkrili, da so bila v vseh vzorcih prisotna tudi protitelesa anti-HBc (100%). V 15 vzorcih (51,8%) so bila prisotna izključno omenjena protitelesa (anti-HBc). V 10 vzorcih (34%) so odkrili tako anti-HBc in protitelesa anti-HBs.

Molekularne osnove OBI odražajo posebnega življenjskega cikla HBV, ki je prikazan na Sliki 5.



**Slika 5.** Shematski prikaz življenjskega cikla HBV; prirejeno po (28).

Temeljni korak je konverzija 3Kb velikega krožnega genoma v kovalentno zaprto krožno DNA (cccDNA). Stabilnost in dolgoročna obstojnost molekul cccDNA ter dolga razpolovna življenjska doba hepatocitov, omogočata, da lahko prebolela okužba s HBV postane ponovno aktivna, v primeru oslabiljenega imunskega sistema gostitelja. Danes vemo, da so posamezniki lahko okuženi z različnimi virusnimi variantami, za katere so značilni: antigeno modificirani S protein HBV, ki ga ne moremo zaznati z razpoložljivimi testi za določanje HbsAg teste ali mutacije, katerih posledica sta bodisi inhibicija izražanja S-gena in/ali replikacije virusa.

### 1.5.3 REAKTIVACIJA OBI

Osebe z OBI lahko doživijo akutno reaktivacijo HBV, pri čemer ponovno izrazijo serološki profil, ki je značilen za hepatitis B. Pri tem imajo pomembno vlogo: A) imunski odziv gostitelja; B) koinfekcije z drugimi virusi, in C) epigenetski dejavniki.

Ad A) Imunski nadzor gostitelja nad HBV ima ključno vlogo v razvoju OBI. Tekom okultne okužbe s HBV se vzpostavi ravnovesje med prisotnim virusom in imunskim sistemom gostitelja. Poleg virusno specifičnih CD8<sup>+</sup> citotoksičnih limfocitov T so tudi citokini, ki nastajajo v jetrih, vpleteni v nadzor replikacije HBV. T-celični odziv proti virusnim antigenom pa je prisoten še veliko let po okrevanju od akutnega hepatitisa B.

Ad B) Največja prevalenca OBI je pri bolnikih, okuženih z virusom hepatitisa C. Z

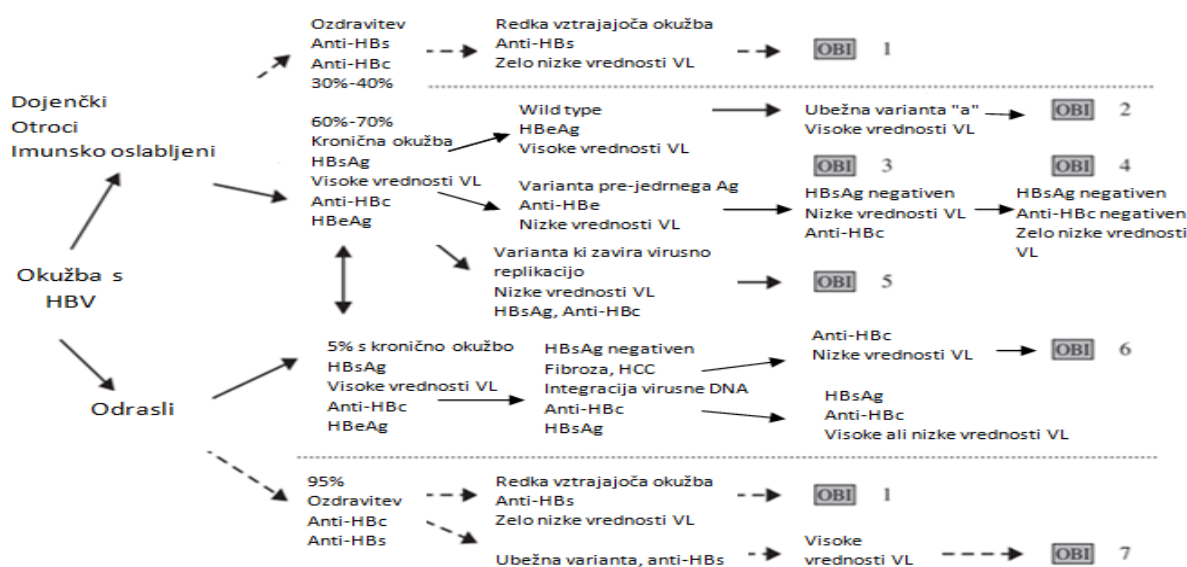
raziskavami *in vitro* so dokazali, da jedrni oz. "core" protein HCV močno inhibira replikacijo HBV. Poleg virusnih pa lahko tudi druge okužbe zavirajo aktivnost HBV.

Ad C) Epigenetski mehanizmi igrajo pomembno vlogo v replikaciji HBV in njegovih transkripcijskih mehanizmi. Supresija replikacije HBV je posledica aktivnih mehanizmov zaviranja virusne transkripcije, ki jih posreduje deacetilaza in metilaza. Ta encima, skupaj z drugimi encimskimi aktivnostmi in signalnimi potmi, povzročita posttranslacijske modifikacije na cccDNA vezanih histonih. Močna supresija aktivnosti HBV je tudi vzrok za odsotnost HbsAg v serumu in za zelo nizke, pogosto nemerljive serumske koncentracije HBV DNA (28).

## 1.6 RAZLIČNE OBLIKE OBI

Pri na videz zdravih osebah z OBI, naletimo na štirih vrste kliničnih stanj (Slika 7):

- prebolelo okužbo s prisotnim protitelesi anti-HBs;
- kronični hepatitis, povezan z ubežnimi mutiranimi oblikami HBV (escape mutants), ki jih ne moremo zaznati z razpoložljivimi testnimi poliklonskimi ali monoklonskimi protitelesi;
- kronični hepatitis s prisotnimi protitelesi anti-HBc, ob sočasni odsotnosti ali prisotnosti protiteles anti-Hbe, in
- kronični hepatitis brez kakršnega koli serološkega označevalca okužbe s HBV, ob sicer prisotni HBV DNA.



Slika 6: Povzetek potencialnih izvorov okultne okužbe z virusom hepatitisa B (OBI);



prirejeno po (29).

Legenda: VL - virusno breme oz. količina virusa; OBI - okultna okužba s HBV; WT - divji tip virusa (ang. wild type); HCC - hepatocelularni karcinom

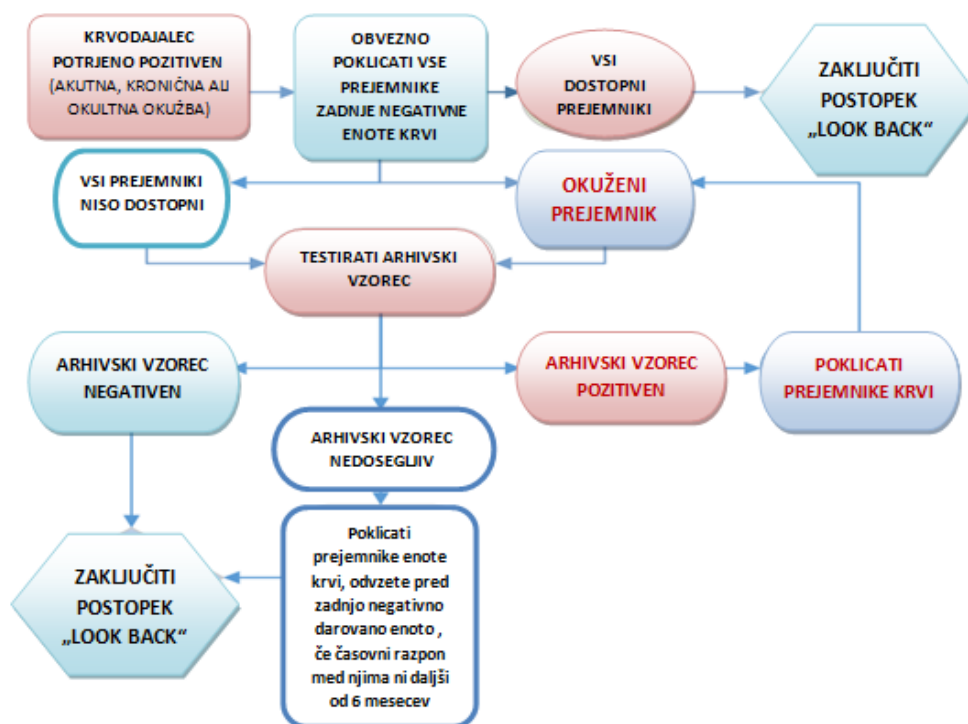
Prebolele okužbe s HBV pri otrocih in odraslih, za katere je značilna prisotnost protiteles anti-HBs so na Sliki 6 prikazane nad in pod črtkanimi črtami in označene z OBI 1 in OBI 7. Tekom kroničnega hepatitisa B se lahko OBI pojavi v naslednjih oblikah (Slika 6): prisotna je ubežna mutacija virusa (ang. escape mutant) (OBI 2); okužena oseba je zdrava in ima prisotna bodisi izključno protitelesa anti-HBc ali pa je brez protivirusnih protiteles (OBI 3 in OBI 4); prisotni so mutanti HBV, ki inhibirajo virusno replikacijo, poleg tega pa imajo tovrstni bolniki tudi protitelesa anti-HBc in HbsAg (OBI 5); bolniki s HCC z omejeno ali nepopolno replikacijo virusne DNA (OBI 6).

V nekaterih osebah, ki so prebolele okužbo s HBV in imajo prisotna protitelesa anti-HBs, se lahko še vedno replicirajo majhne količine HBV DNA (5 – 1.000 IU/mL), ki jih leta pozneje zaznajo v jetrih, mononuklearnih celicah periferne krvi ali v serumu (29). Eden od možnih razlogov za vzdrževanje majhnega obsega replikacije HBV je tudi nezadosten citotoksični odziv CD8 limfocitov T, ki ni sposoben uničiti vseh virusov.

## **1.7 POSTOPKI VPOGLEDA NAZAJ (»LOOK-BACK«) IN IZSLEDITVE (»TRACE-BACK«)**

### **1.7.1 POSTOPKI »LOOK-BACK«**

Postopek »look-back« je skupek ukrepov, ki jih izvedemo potem, ko ugotovimo, da je določen krvodajalec, ki je predhodno že daroval kri, bodisi okužen s povzročitelji, katerih prisotnost preverjamo rutinsko, ali pa z drugimi, ki prav tako lahko izzovejo s krvjo prenosljive bolezni, a jih ne testiramo redno, čeprav bi lahko škodili zdravju prejemnika krvi. Cilj je torej zaščita zdravja prejemnikov predhodnih ali prihodnjih enot krvnih pripravkov in preprečitev nadaljnjega širjenja okužb. Na Sliki 7 je prikazan algoritem izvajanja postopka »look-back«.



**Slika 7:** Izvajanje postopka »look-back«; prirejeno po (15).

### **1.7.2 POSTOPKI »TRACE-BACK«**

Postopek »trace-back« je skupek ukrepov, ki jih izvedemo potem, ko z ustreznimi laboratorijskimi testi potrdimo okužbo in objektivno sumimo, da je bila povzročena s transfuzijo krvnega pripravka. Cilj postopka je, da okuženemu krvodajalcu prepovemo nadaljnje darovanje krvi ter obvestimo vse prejemnike pripravkov, izdelanih iz okužene enote krvi, o možnem prenosu okužbe in jih obenem pozovemo na testiranje (15).

Zakonodaja, ki pokriva področje transfuzijske dejavnosti, ki zagotavlja varnost transfuzijskega zdravljenja je v RS in RH v celoti usklajena usklajena z Direktivo Sveta Evrope 2005/61/EC oz. z veljavno evropsko legislativo za plazmo, namenjeno frakcioniranju (Evropska Farmakopeja 0853, Ph. Eur. Monograph: „Human plasma for fractionation“).

## **1.8 PREVENTIVA IN ZDRAVLJENJE HEPATITISA B**

### **1.8.1 PREVENTIVA OKUŽB S HBV**

Ob standardnih ukrepih za preprečevanje širjenja okužbe v okviru družin in v medicinskih ustanovah se izvajajo tudi postopki, ki zajemajo aktivno in pasivno imunsko profilakso. Aktivno predstavlja cepljenje proti hepatitisu B, kar je dokazano učinkovit način zaščite pred okužbo s HBV. Uvedli so ga leta 1982, WHO pa je cepljenje proti HBV novorojenčkov

uvrstila v najvišjo prioriteto globalne zaščite zdravja. WHO podpira tudi vse ostale strategije cepljenja, ki so v skladu z epidemiološkimi pokazatelji, npr. cepljenje adolescentov in posebnih rizičnih skupin. Cepivo proti HBV deluje preventivno tudi na bolnike s HCC. Imunogen, ki ga uporabljamo za cepljenje, je rekombinantni HBsAg. Slabši odziv na cepivo imajo kadilci, ljudje s preveliko telesno maso, osebe s cirozo in prizadeto funkcijo ledvic. Imunski odziv po cepljenju je odvisen od aktivacije antigensko specifičnih klonov limfocitov T in B, v njem pa sodelujejo tudi naravne celice ubijalke (NK) in in naravne T-celice ubijalke (NKT). Osebe, ki ne reagirajo na cepivo, pa imajo nezadosten T-celični odziv (24).

Pasivna imunska zaščita z imunoglobulini proti HBV (HBIg) se za odrasle uporablja po izpostavitvi virusu (postekspozicijsko), s čemer dosežemo zaščito, ki traja največ šest mesecev.

### **1.8.2 ZDRAVLJENJE**

Obstajata dva načina zdravljenja hepatitisa B, in sicer z interferonom alfa (IFN- $\alpha$ ) ter z analogi nukleotidov in nukleozidov. Interferon-alfa je naravni citokin z imunomodulatornim protivirusnim delovanjem (25). Lamivudin (3TC) je analog citozina, ki se vgrajuje na njegovo mesto v molekuli DNA in tako ustavi njeno sintezo, s tem pa replikacijo HBV. Zelo je učinkovit pri bolnikih z napredovano fibrozo in cirozo jeter (26).

V posameznih primerih lahko pride do preboja s cepivom izzvane imunosti, tekom katerega se pojavijo znaki reaktivacije oz. preboja HBV (npr. prisotnost ali porast titra HBV DNA). Pojav okužbe med cepljenimi osebami lahko pojasnimo z morebitno prisotnostjo visokih titrov virusov z genotipi, ki niso bili zajeti v uporabljenem cepivu, ali pa z nezanesljivo evidenco o cepljenju. Preboj okužbe s HBV pa je običajno povezan tudi s pojavom rezistence na protivirusna sredstva, ki jih uporabljamo za preprečevanje ponovnih okužb (33).

## ***II. NAMEN DELA***

Naloga transfuzijske službe je zagotavljanje zadostne količine varne krvi za zdravljenje. Pri osebah z okultnim hepatitisom B (OBI), je HBV DNA prisotna v nizkih serumskih koncentracijah, <100, včasih tudi <10 IU HBV DNA/mL, zato jo je zelo težko odkriti. Pri osebah z okultnim hepatitisom B (OBI), ne moremo zaznati prisotnosti HbsAg v krvi, zato samo serološko presejalno testiranje ne zadošča za odkrivanje okužbe s HBV. Zato danes za presejalno testiranje uporabljamo metode specifičnega določanja prisotnosti virusnih nukleinskih kislin (testiranje NAT), s katerim zelo učinkovito odkrivamo OBI pri večkratnih darovalcih krvi.

Cilji našega dela so:

1. Opisati in primerjati trenutna sistema darovanja krvi v RS in RH.
2. Opisati epidemiologijo hepatitisa B v RS in RH od leta 2010 do leta 2015.
3. Analizirati in primerjati podatke serološkega testiranja krvodajalcev na prisotnost HbsAg od leta 2007 do leta 2015.
4. Analizirati in primerjati podatke testiranja NAT krvodajalcev z OBI v RS od leta 2007 do leta 2009 in v RH od leta 2013 do leta 2015.
5. Kronološko primerjati prevalenci hepatitisa B, od leta 1998 do leta 2015, v obeh državah.
6. Opisati in primerjati izvedene postopke vpogleda nazaj (»look-back«) od leta 2013 do leta 2016.

### **III. MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 VIRI PODATKOV**

V magistrski nalogi smo uporabili podatke Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino v Ljubljani (ZTM) in Hrvaškega zavoda za transfuzijsko medicino v Zagrebu (HZTM), ter tiste, pridobljene iz izbranih enot dosegljive strokovne literature. Predstavljeni in primerjani rezultati so bili pridobljeni s presejalnim serološkim (HbsAg) ter testiranjem NAT (HBV DNA) krvodajalcev za odkrivanje OBI.

#### **3.2 METODE, UPORABLJENE ZA TESTIRANJA NAT**

Testiranje NAT na HCV so v RS uvedeli leta 1999, izvajali pa so ga na analizatorju Cobas Amplicor (Roche Diagnostics, Branchburg, ZDA), in sicer z metodo RT-PCR. Pri tem niso testirali posameznih vzorcev, pač pa njihove zlivke (6 - 8 vzorcev). Leta 2007 so testiranje NAT na HCV razširili še na HBV in HIV, in sicer v vzorcih posameznih krvodajalcev. Testiranje od tedaj dalje izvajajo z metodo TMA, najprej na sistemu Procleix Tigris, danes pa na analizatorju Procleix Panther, ob uporabi reagentov Procleix Ultrio Elite (Hologic, Grifols). V RH za testiranje prisotnosti HBV, HCV in HIV prav tako uporabljajo metodo TMA, in sicer na sistemu Procleix Tigris, pri čemer uporabljajo reagente Procleix Ultrio Plus. Virus hepatitisa B se tekom serokonverzije replicira počasneje kot HIV in HCV. Nizke ravni DNA HBV lahko v serološko negativnih vzorcih zasledimo le tekom zgodnjih stadijev okužbe, protitelesa anti-HBc v vzorcih, ki so negativni na HbsAg, pa kasneje po okužbi. Trojni test TMA vključuje tri glavne reakcijske korake, ki potekajo v eni sami epruveti, in sicer: izolacijo NK iz preiskovanega vzorca (RNA HIV-1, RNA HCV in DNA HBV), njihovo pomnoževanje, posredovano s prepisovanjem RNA (metoda TMA) in nato še detekcijo pomnoženih produktov z metodo HPA (ang. Hybridization Protection Assay). Kemiluminiscenčni test TMA temelji na uporabi dveh encimov, in sicer reverzne transkriptaze MMLV in polimeraze RNA T7. Detekcijo pomnoženih amplikonov RNA izvedemo s testom HPA. Komplementarne, enoverižne sonde, označene s kemiluminiscenčnimi molekulami, se specifično vežejo na pomnožene amplikone RNA. Dodani selekcijski reagent razlikuje med vezanimi in nevezanimi sondami in uniči kemiluminiscenčne molekule na slednjih (nevezane sonde). Kemiluminiscenčne signale, ki jih generirajo hibridizirane sonde izmerimo z luminometrom, v obliki relativnih svetlobnih enot (RLU).

Vsakemu vzorcu, kontroli in kalibratorju obvezno dodamo notranjo kontrolo. Na pomnožene amplikone RNA notranje kontrole se vežejo zanje specifične kemiluminiscenčno označene sonde, ki imajo po vezavi hitrejšo kinetiko emisije svetlobe. Njihovi signali zatonjihovi signali pobliskujejo, medtem ko tisti, ki jih generirajo, sijajo oz. svetijo, kar omogoča ločevanje med njimi (za specifično pomnožene amplikone za HIV-1 RNA, HCV-RNA, HBV-DNA).

### ***3.3 STATISTIČNA OBDELAVA IN PREDSTAVITEV REZULTATOV***

Rezultate smo statistično obdelali in grafično prikazali s pomočjo računalniškega programa Microsoft Excel.

## **IV. REZULTATI**

### **4.1 DAROVANJE KRVI**

V RS v povprečju potrebujemo okoli 300 do 350 krvodajalcev dnevno, da bi zagotovili potrebno količino krvi, kar Slovenijo uvršča v evropsko povprečje. Prostovoljni krvodajalci so pomemben del zdravstvenega sistema, saj bolnikom omogočajo zdravljenje s krvjo oz. njenimi sestavinami.

Oskrba s krvjo obsega tri področja: darovanje krvi, njen odvzem/zbiranje, predelavo in testiranja ter področje klinične uporabe. Za zagotavljanje zadostnega števila krvodajalcev je v RS primarno zadolžen Rdeči križ Slovenije, ki je obenem tudi glavni organizator krvodajalskih akcij. Pri tem mu je v pomoč tudi Transfuzijska služba, ki je sicer odgovorna za zbiranje, predelavo, testiranje, shranjevanje in oskrbo s krvjo. Skrbi za zagotavljanje zadostne količine varne krvi in njenih komponent, s čimer bolnikom zagotavlja kar najboljše možno transfuzijsko zdravljenje. Predelava zbrane krvi v komponente poteka na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino v Ljubljani (ZTM), v Centru za transfuzijsko medicino Univerzitetnega kliničnega centra (UKC) Maribor (CTM) in na Transfuzijskem centru Splošne bolnišnice (SB) Celje (TC). Transfuzijsko službo v RS tvorijo: Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (ZTM) s pripadajočimi centri za transfuzijsko dejavnost, ki so locirani v SB Novo mesto, Trbovlje, Slovenj Gradec, Izola, Jesenice in Nova Gorica, Center za transfuzijsko medicino UKC Maribor s priključenima enotama v SB Ptuj in v SB Murska Sobota ter Transfuzijski center SB Celje. Organizacijska ureditev in načela dela transfuzijske dejavnosti so predpisani z Zakonom o preskrbi s krvjo (ZPkrv-1), ki je bil sprejet leta 2006, ter s številnimi z njim povezanimi podzakonskimi akti. Ti pravni dokumenti so podlaga za:

- omogočanje zdravljenja s krvjo, krvnimi komponentami in pripravki vsakemu bolniku, ki tovrstno zdravljenje potrebuje;
- nenehno zagotavljanje oskrbe s krvjo, krvnimi komponentami in pripravki v količinah, ki zadostujejo za zdravljenje bolnih in diagnosticiranje.
- doseganje najvišjih možnih standardov in upoštevanje novih znanstvenih dognanj na področjih zbiranja krvi, laboratorijskih preiskav, pripravi krvnih komponent in pripravkov, itd.

V RH dnevno potrebujejo od 650 do 700 enot krvi. Hrvaški Rdeči križ in Hrvaški zavod za transfuzijsko medicino sta, skladno z zakonskimi predpisi, odgovorna za promocijo krvodajalstva in organiziranje krvodajalskih akcij.

Transfuzijska služba RH je razdeljena na bolnišnične transfuzijske enote, ki so odgovorne za transfuzijsko zdravljenje bolnikov ter transfuzijske enote, katerih naloge so: zbiranje krvi, proizvodnja krvnih komponent in pripravkov, imunohematološko, serološko in molekularno-biološko testiranje odvzetih vzorcev krvi in oskrba bolnišnic z zadostno količino varnih in kakovostnih krvnih pripravkov. V drugo skupino, ob Hrvaškem zavodu za transfuzijsko medicino v Zagrebu (HZTM) sodijo še trije regionalni (Osijek, Rijeka, Split) in trije sub-regionalni (Dubrovnik, Varaždin, Zadar) transfuzijski centri. V preteklem letu so skupaj zbrali preko 192.000 enot krvi. V HZTM in vseh treh regionalnih transfuzijskih centrih izvajajo serološka testiranja za vzorce lokalno zbranih enot krvi na označevalce okužb, ki se prenašajo s krvjo (HBV, HCV, HIV in sifilis). Molekularno-biološko testiranje NAT vseh posameznih vzorcev pa se, tako kot v RS, izvaja v centralno, v HZTM. Vzorce tekom popoldneva in zvečer iz vseh centrov dostavljajo z organiziranim prevozom v Zagreb, testiranje pa se izvede ponoči, tako, da so rezultati že naslednje juto dostopni vsem centrom preko skupnega nacionalnega informacijskega programa (e-Delphin).



## **4.2 EPIDEMIOLOGIJA VIRUSNEGA HEPATITISA B**

Po podatkih WHO je okrog 5% svetovne populacije okužene s HBV, pri čemer je v Evropi ta delež okoli 1,6%. Glede na pogostost prenašalcev HbsAg, razlikujemo države z visoko (8%-20%), zmerno (3%-7%) in nizko prevalenco (0,1-2%).

V evropskih državah je število na novo odkritih primerov okužb s HBV v zadnjih desetih letih v upadu, pri čemer pa incidenca akutnih okužb niha med 1,5/100.000 prebivalcev v zahodni Evropi, do npr. 33/100.000 prebivalcev v Estoniji. Prevalenca kroničnih okužb s HBV pa je v razponu od <0,5% v zahodni Evropi do 8% v Turčiji. Delež prenašalcev ženskega spola je v Evropi 30%, in sicer največ v starosti od 15-24 let, moški (70%) pa so večinoma stari od 24-44 let (34).

V RH ocenjujejo, da predstavljajo prenašalci HBV 2% splošne populacije. Po podatkih Službe za epidemiologijo, Hrvaškega zavoda za javno zdravstvo, pa sta števili prenašalcev in prijav akutnih okužb v upadu (30). Posebej pomembno je dejstvo, da je v zadnjih 20 letih prišlo do zmanjšanja števila primerov akutnega hepatitisa B za kar 75,6% in števila mladih prenašalcev (15-29 let) za 60,7%. Med prenašalci sedaj prevladujejo osebe v starostni skupini od 30-39 let.

Od leta 2010 do 2015 je bila povprečna stopnja novo odkritih akutnih in kroničnih okužb s HBV v slovenski populaciji v razponu od 1,9 primerov/100.000 prebivalcev v letu 2014, do največ 3,4 primerov/100.000 prebivalcev v letu 2011 (31).

V RS so preučevali prevalenco protiteles anti-HBc, da bi ugotovili prekuženost populacije slovenskih krvodajalcev s HBV in ocenili verjetnost pojavljanja OBI ter možnosti prenosa okužbe s krvjo, s tem pa tudi upravičenost uvedbe presejalnega testiranja anti-HBc. Presejalno so testirali 5.959 krvodajalcev in odkrili 179 ponovljeno pozitivnih rezultatov anti-HBc (3,00%). Izključno anti-HBc pozitivnih vzorcev je bilo 55 (69,83% vseh anti-HBc pozitivnih oz. 0,90% vseh testiranih). Število enot krvi, ki so vsebovale tako protitelesa anti-HBc kot anti-HBs, pa je bilo 124 (2,10% vseh testiranih). Med spoloma ni bilo statistično značilnih razlik v prekuženosti (moški 3,00%, ženske 2,99%). Po pričakovanjih pa je bila ta večja pri starejših krvodajalcih. Končna ugotovitev je bila, da bi s lahko presejalnim testiranjem prisotnosti protiteles anti-HBc sicer še dodatno prispevali k zmanjševanju preostalega tveganja za prenos okužbe s HBV s krvjo, vendar pa bi bili s tem povezani stroški in posledična izguba 3% darovanih enot, neupravičeni (35).

Razen spremljanja epidemioloških podatkov glede okužb s HBV v splošni populaciji, na Nacionalnem inštitutu za javno zdravje (NIJZ) beležijo tudi njeno pojavnost med intravenskim uživalci drog, ki prvič ali ponovno vstopajo v nacionalni program preventive in zdravljenja odvisnosti (31).

### 4.3 PRIMERJAVA SEROLOŠKEGA TESTIRANJA KRVODAJALCEV NA HbsAg V RS IN RH (2007 - 2015)

**Preglednica V:** Izsledki serološkega testiranja krvodajalcev na HbsAg ter podatki o incidenci in prevalenci v RS in RH.

Serološko presejalno testiranje HbsAg								
	SLOVENIJA				HRVAŠKA			
Leto:	Število enot	Število pozitivnih enot	Prevalenca/10 <sup>5</sup> enot krvi	Incidenca/10 <sup>5</sup> enot krvi	Število enot	Število pozitivnih enot	Prevalenca/10 <sup>5</sup> enot krvi	Incidenca/10 <sup>5</sup> enot krvi
2007	84.586	12	14	0	161.038	29	18	5,43
2008	91.737	11	12	1,23	166.347	39	23	7,73
2009	95.856	11	11	0	176.617	27	15	4,30
2010	96.637	11	11	1,16	176.891	15	8	3,02
2011	99.377	9	9	1,15	177.650	21	12	0,59
2012	94.721	8	8	3,57	182.068	16	9	2,94
2013	90.768	9	10	2,48	183.072	15	8	1,77
2014	87.826	8	9	0	183.410	15	8	7,82
2015	87.697	3	3	0	193.312	13	7	/

Vir podatkov: letna poročila ZTM in HZTM.

Od leta 2007 do 2015 je bilo v RS opravljenih približno 92.000 darovanj krvi, v RH pa okrog 170.000. Delež zbranih enot krvi na letni ravni se izračuna glede na število prebivalcev in znaša 5% v RS in 4% v RH. V Preglednici V smo zbrali rezultate letnih seroloških testiranj krvodajalcev na HbsAg, ki so bila izvedena v obdobju od 2007 do 2015. Prikazali smo tudi prevalenco in incidenco okužb s HBV na 10<sup>5</sup> odvzetih enot krvi. Prevalence smo podali na 100.000 odvzetih enot krvi, incidence pa na 100.000 enot krvi, odvzetih le večkratnim

(stalnim) darovalcem. Prevalence okužb s HBV v RS in RH smo kronološko prikazali v Grafu 1. V RH je bilo serološko testiranje na HBsAg z metodo EIA uvedeno leta 1973, v RS pa leta 1970. Približno enak časovni okvir uvedbe odraža približno enake socialno-ekonomske in epidemiološke razmere v obeh državah. Pomembna razlika pa se pojavi najprej leta 2000, ko v RS uvedejo testiranje krvodajalcev z metodo NAT (TMA) na prisotnost RNA HCV, nato pa še leta 2007, ko prav tako v RS začnejo z rednim testiranjem NAT na prisotnost nukleinskih kislin treh virusov, in sicer DNA HBV, RNA HCV in RNA HIV1. V RH so tovrstno testiranje uvedli leta 2013.

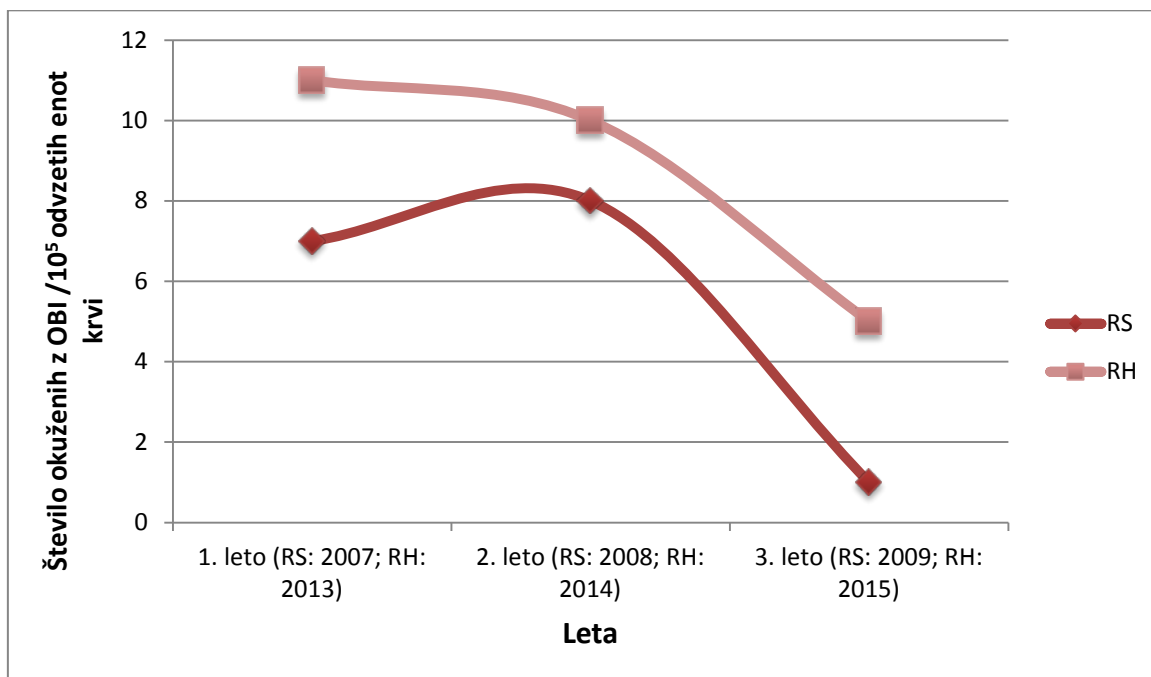
#### **4.4 PRIMERJAVA PODATKOV TESTIRANJA NAT OBI V RS IN RH**

**Preglednica VI:** Rezultati testiranj NAT na DNA HBV prostovoljnih krvodajalcev z OBI v RS (2007-2009) in RH (2013-2015)

<b>SLOVENIJA</b>			
<b>Leto:</b>	Število enot krvi	Število <b>HBV- pozitivnih</b> enot	Prevalenca/10 <sup>5</sup> enot krvi
<b>2007</b>	84.586	<b>6</b>	7
<b>2008</b>	91.737	<b>7</b>	8
<b>2009</b>	95.856	<b>1</b>	1
<b>HRVAŠKA</b>			
<b>Leto:</b>	Število enot krvi	Število <b>HBV- pozitivnih</b> enot	Prevalenca/10 <sup>5</sup> enot krvi
<b>2013</b>	183.072	<b>21</b>	11
<b>2014</b>	183.410	<b>18</b>	10
<b>2015</b>	193.312	<b>10</b>	5

Vir podatkov: Letna poročila ZTM in HZTM.

Zaradi ustrežnejše primerjave med RS in RH, smo zbrali podatke o rezultatih, zabeleženih v prvih treh letih po uvedbi testiranja NAT na DNA HBV v posamezni državi (RS: 2007 - 2009; RH: 2013 - 2015). V preglednici VI so predstavljeni podatki o številu DNA HBV pozitivnih enot krvi oz. krvodajalcev, odkritih v obeh državah v omenjenih triletnih obdobjih. Vsi NAT-positivni rezultati so posledica prisotnosti OBI. Graf 1 prikazuje triletni prevalenci krvodajalcev s pozitivnimi testi NAT na DNA HBV oziroma krvodajalcev z OBI v obeh državah.

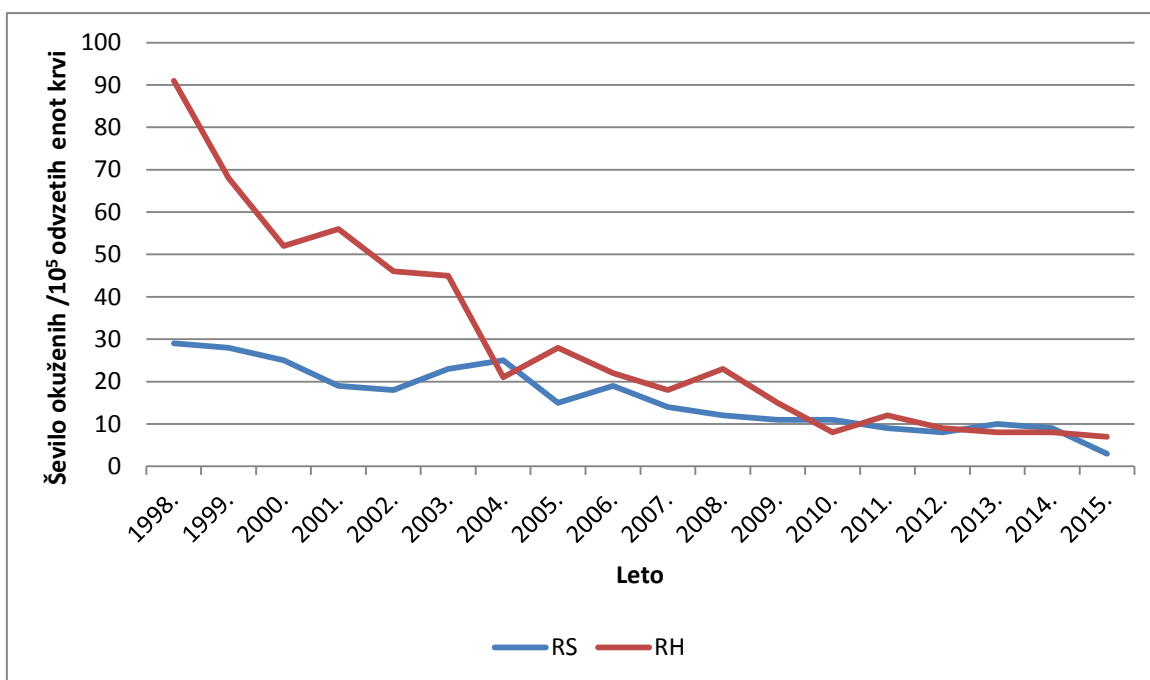


**Graf 1:** Primerjava prevalenc krvodajalcev z OBI, odkritih s testom NAT v treh letih od njegove uvedbe v RS (2007 - 2009) in RH (2013 – 2015).

Prevalenca OBI v prvem letu izvajanja testiranja krvodajalcev z NAT na DNA HBV je bila v obeh državah visoka. Razlog za to je v tem, da so bila v RS do leta 2007, v RH pa do leta 2013, dostopna samo serološka testiranja za ugotavljanje hepatitisa B, s katerimi pa ne moremo odkriti oseb z OBI. Ker je bilo diagnostično okno za okužbo s HBV pred uvedbo testiranja NAT širše, številnih krvodajalcev z OBI niso odkrili. S postopki NAT lahko potrdimo tudi akutne virusne okužbe, ki jih s serološkim presejalnim testiranjem zaradi različnih razlogov ne odkrijemo. Izrazit upad števila krvodajalcev z OBI je bil v obeh državah viden že v tretjem letu po uvedbi testiranja NAT, pri čemer sta bili prevalenci  $1/10^5$  darovanih enot krvi v RS (2009) in  $5/10^5$  darovanih enot krvi v RH (2015). Z uvedbo presejalnega

testiranja NAT krvodajalcev se je torej pomembno znižala prevalenca OBI, s tem pa povečala varnost transfuzije krvnih pripravkov.

#### **4.5 KRONOLOŠKA PRIMERJAVA PREVALENCE OKUŽBE S HBV PRI KRVODAJALCIH V RS IN RH**



**Graf 2:** Kronološka primerjava prevalenc okužbe s HBV v RS (modra krivulja) in RH (rdeča krivulja), v obdobju od 1998 - 2015.

Graf 4 prikazuje kronološko primerjavo prevalenc okuženih oseb s HBV v RS in RH tekom osemnajstih let (1998 - 2015). Vidimo, da je bila prevalenca okužbe s HBV v 90-ih letih v obeh državah večja kot je danes. To se še posebej nanaša na RH, kjer je bila ta do leta 2001  $>50/10^5$  darovanih enot krvi. Razlog za tako veliko število HBV-pozitivnih krvodajalcev v 90-ih letih je zagotovo prihod večjega števila beguncev iz BIH v RH zaradi vojne. Posledično se je povečala naseljenost na prostoru RH, znižal pa se tudi življenjski standard. Danes so te številke znatno nižje, in sicer zaradi uvedbe obveznega cepljenja ter vakcinacije rizičnih skupin, boljše osveščenosti ter boljšega ekonomskega stanja. Z ozirom na trenutna dogajanja v svetu in masovnega prihoda beguncev iz Sirije, Iraka, Afganistana in drugih držav v Evropo, obstaja tako v RH in RS kot tudi v drugih državah Evrope možnost ponovnega porasta

hepatitisa B. Zdravstveni sistemi morajo zato izboljšati preventivne ukrepe in zdravljenje hepatitisa. Kot smo že omenili, je po priporočilih WHO poleg cepljenja rizičnih skupin zelo pomembno cepiti tudi novorojenčke, saj je to najučinkovitejši način za preprečevanje prenosa okužbe z matere na otroka.

#### **4.6 POSTOPKI VPOGLEDA NAZAJ (»LOOK BACK«)**

Na Hrvaškem v okviru dejavnosti transfuzijske medicine od leta 2013 izvajajo postopke »look-back«, skladno s priporočili, ki jih je tega leta izdal HZTM. Priporočila se upoštevajo pri potrjevanju morebitnih okužb s HIV-1, HBV in HCV večkratnih krvodajalcev. V okviru predpisanih postopkov vabijo prejemnike pripravkov, izdelanih iz zadnje še seronegativne enote krvi darovalca, kakor tudi prejemnike krvnih pripravkov krvodajalcev z OBI, pri katerih z naknadnim testiranjem arhivskih vzorcev dokažejo DNA HBV. Leta 2013 so postopke »look-back« izvedli zaradi 21 odkritih primerov OBI in 3 akutnih okužb s HBV. Pri tem so za verjetnega ocenili samo en prenos HBV s krvodajalca z OBI na prejemnika. Ta je namreč imel osem mesecev po prejeti transfuziji sveže zmrznjene plazme v krvi prisotne označevalce prebolele okužbe s HBV.

Tekom leta 2014 so na HZTM izvedli 11 postopkov »look-back« zaradi odkritih OBI in 1 zaradi potrjene akutne okužbe krvodajalca s HBV. Enega od omenjenih postopkov so obravnavali kot sum na okužbo s HBV večkratnega krvodajalca, vendar so nato ugotovili, da je bil ta teden dni pred darovanjem krvi cepljen s cepivom, ki je vsebovalo rekombinantni HbsAg, zato so postopek ustavili. Od vseh ostalih primerov pa je bil samo eden tak, pri katerem obstaja verjetnost transfuzijskega prenosa HBV s krvodajalca z OBI na prejemnico, katere zdravstveno stanje še vedno spremljajo.

V letu 2015 so na HZTM izvedli postopke »look-back« za 15 večkratnih krvodajalcev, od tega pri 7 zaradi OBI. V dveh primerih krvodajalcev z OBI so postopek ustavili potem, ko so naknadno testirali devet arhivskih vzorcev, ki so bili vsi negativni v testu ID-NAT. Za 4 krvodajalce z OBI pa so postopek zaključili potem, ko so ugotovili, da so bili prejemniki pripravkov, izdelanih iz zadnjih darovanih enot krvi negativni v testih ID-NAT in seroloških testih. Eden od prejemnikov omenjenih transfuzij je umrl. Za vse v tem letu izvedene postopke

»*look-back*« velja, da z njimi niso ni dokazali prenosov okužbe s HBV s krvodajalcev na prejemnike transfuzij.

V RS se postopki *look-back* ne izvajajo rutinsko, temveč le po prijavi s transfuzijo prenesene okužbe ali TTI (transfusion transmitted infection). En primer prenosa HBV s transfuzijo so ugotovili leta 2013, saj je imel prejemnik transfuzije 146 dni po njej v krvi prisoten HbsAg ter protitelesa anti-HBc in anti-HBe. Poleg tega so mu s testom NAT določili 812.000 IU/mL DNA HBV. Postopek je bil zaključen. V drugem primeru prenosa HBV v tem letu pa so 4 dni po transfuziji v prejemnikovi krvi določili protitelesa anti-HBs, in sicer v koncentraciji 36 IU/mL, nato pa 139 dni po transfuziji še HbsAg ter protitelesa anti-HBc in anti-HBe. Poleg tega so s testom NAT določili tudi <1.500 IU/mL HBV DNA. Tudi ta postopek je zaključen.

V letu 2015 so v RS izvedli raziskavo, v okviru katere so preverili vse prejemnike sveže zmrznjene plazme, ki jo je daroval krvodajalec z OBI. Pri 2 so prenos HBV zanesljivo dokazali, pri 1 pa je bil zelo verjeten. V preostalih 3 primerih dokazano ni prišlo do prenosa, en prejemnik pa je že pred začetkom raziskave umrl.

Letos (2016) je bil prijavljen en sum prenosa okužbe HBV. Krvodajalec ima dokazano prisotna le protitelesa anti-HBc, test NAT DNA HBV pa je negativen. Trenutno raziskujejo možnost transfuzijskega prenosa HBV na 2 prejemnika.

## **V. RAZPRAVA**

Virus hepatitisa B predstavlja velik globalni zdravstveni problem. Še posebej je problematična kronična oblika hepatitisa B (OBI), in sicer zaradi možnega poznejšega razvoja kronične jetrne insuficience, ciroze in hepatocelularnega karcinoma (HCC). Poleg tega je velika težava tudi v tem, da osebe z OBI še leta pozneje lahko prenesejo HBV na druge osebe. Cepljenje proti hepatitisu B je učinkovita preventiva okužbe s HBV. Danes se, kljub visoko občutljivim diagnostičnim testom, številne nalezljive bolezni, vključno s HBV, še vedno lahko prenesejo s transfuzijo krvi oz. krvnih pripravkov, s krvodajalca na prejemnika. To dejstvo je v razvitih državah privedlo do sprejetja in izvajanja strogih standardov na področju transfuzijske medicine. Ti vključujejo različne oblike presejalnih testiranj krvodajalcev, od določanja ravni hemoglobina, preko zastavljanja množice standardnih ustnih in pisnih vprašanj, do skrbnih laboratorijskih testiranj darovanih enot krvi na povzročitelje okužb. Njihov skupni cilj je, da bi se približali ničelni stopnji tveganja za prenos okužb. Laboratorijski testi, ki jih trenutno uporabljamo v ta namen, temeljijo na molekularno-bioloških metodah, izboljšani serologiji in tehnologijah virusne inaktivacije. V primeru HBV serološko obvezno določamo HbsAg, po izbiri pa tudi prisotnost protiteles anti-HBc, anti-HBs in IgM anti-HBc. Poleg tega pa lahko vrednotimo tudi aktivnost jetrnih encimov. Nedvomno pa v obvezni program presejalnega testiranja krvodajalcev sodi najboljčutljivejše testiranje NAT, s katerim neposredno določamo prisotnost DNA HBV v krvnih vzorcih.

Presejalno testiranje NAT (Nucleic acid amplification Technology) prostovoljnih krvodajalcev torej izvajamo zato, da bi izrazito povečali varnost transfuzije krvi oz. krvnih pripravkov. Testiranje krvnih vzorcev posameznih krvodajalcev, tako imenovani ID-NAT, se izvaja tako v RS kot RH. Z njim lahko odkrijejo akutne virusne okužbe med serološkim diagnostičnim oknom, poglaviti cilj pa je, da s tovrstnim testiranjem zmanjša preostalo tveganje za prenos z virusom okužene krvi oz. krvnih pripravkov, ki je vezano na obdobje pred serokonverzijo diagnostičnega okna ali na prisotnost OBI. Z uvedbo presejalnega testiranja NAT krvodajalcev, in sicer v obeh primerjanih državah so se občutno zmanjšali: pogostost transfuzijskega prenosa HBV, prevalenca OBI in širina oz. čas diagnostičnega okna. Glavna prednost testiranja NAT pa je v tem, da lahko DNA HBV odkrijemo že 15 dni po okužbi.



V RS so uvedli testiranje NAT na RNA HCV leta 2000, na DNA HBV in RNA HIV-1 pa leta 2007, medtem ko so v RH začeli s testiranjem vseh treh virusnih nukleinskih kislin z ID-NAT leta 2013. Okultni hepatitis B (OBI) je stanje okužbe, ko se HBV sicer replicira, vendar pa njegovo prisotnost zaradi odsotnosti serološkega označevalca HbsAg in zelo nizkih koncentracij DNA HBV v krvi okuženih, zelo težko odkrijemo. Poleg tega, da je OBI večinoma asimptomatski, predstavlja tudi veliko nevarnost za potencialne prejemnike krvi, zlasti tiste, ki so imunsko oslabljeni. Prav zaradi te specifičnosti OBI, je uvedba presejalnega testiranja NAT krvodajalcev občutno povečala varnost transfuzij krvi in krvnih pripravkov ter zmanjšala prevalenco tovrstnih okužb. Najpogosteje imajo OBI osebe, okužene s HCV, in bolniki na kronični hemodializi. Ponavljajoče se okužbe s HBV se pojavljajo predvsem pri osebah, ki so okužbo prebolele, pozneje pa zaradi različnih vzrokov postane imunsko oslABLjene. Prebolela okužba s HBV lahko postane ponovno aktivna zaradi molekularnih lastnosti virusa oz. zaradi stabilnosti njegove kovalentno zaprte krožne DNA (cccDNA). Pomembno je pripomniti, da imajo v induciranju okultne HBV okužbe pomembno vlogo imunski odziv gostitelja, druge koinfekcije in epigenetski faktorji.

Prav zaradi te specifičnosti OBI je zelo pomembno, da jo uspemo detektirati, saj se s tem izognemo možnemu prenosu s krvodajalca na prejemnika. Najučinkovitejši in najprimernejši način preventive pred okužbo s HBV je cepljenje. Obvezno cepijo novorojenčke HbsAg pozitivnih mater, adolescente ter rizične skupine. Cepljenje se izvaja pred vstopom v šolo (pri 6 letih). Glede na to, da so cepljenje uvedli šele leta 1982, zaključujemo, da sodijo v rizično skupino za OBI tiste osebe, ki niso bile cepljene ter starejši, ki so sicer izpostavljeni povečanemu tveganju za obolenost. Po cepljenju oseba zadrži imunost na HBV doživljenjsko ne glede na to, da v njihovi krvi zaščitna protitelesa padejo pod prag zaznave, saj imajo prisotne specifične spominske imunske celice.

V RS je za promocijo darovanja krvi in zagotavljanje zadostnega števila krvodajalcev, z zakonom zadolžen Rdeči križ Slovenije, ki je obenem tudi nacionalni organizator krvodajalskih akcij. Transfuzijska služba v RS sodeluje pri promociji krvodajalstva, z zakonom o preskrbi s krvjo (ZPkrv-1) pa je zadolžena za zbiranje, testiranje in predelavo krvi ter za zagotavljanje in distribucijo zadostnih količin varnih in primernih krvnih pripravkov. V RH za področje krvodajalstva skrbita Hrvaški Rdeči križ (Hrvatski Crveni križ) in Hrvaški zavod za transfuzijsko medicino (Hrvatski zavod za transfuzijsku

medicinu). Hrvaški Rdeči križ v sodelovanju s transfuzijsko službo izvaja promocijo krvodajalstva in organizira krvodajalske akcije. Transfuzijska služba RH je zadolžena za zbiranje krvi, imunohematološko, serološko in molekularno-biološko testiranje krvodajalcev, predelavo krvi ter oskrbo bolnišnic z zadostno količino varnih in kakovostnih krvnih pripravkov.

Primerjalno smo predstavili tudi epidemiologijo hepatitisa B v obeh državah. Zaključimo lahko, da število primerov akutnega hepatitisa in število kroničnih nosilcev HBV, predvsem zahvaljujoč cepljenju, v zadnjih 20 letih izrazito upada. Največ prenašalcev HBV je med krvodajalci, starimi med 30 in 39 let.

Ko smo primerjali serološko testiranje HbsAg krvodajalcev v obdobju od leta 2007 do 2015, smo opazili, da sta obe državi testno metodo EIA uvedli v približno enakem času, kar je verjetno posledica podobnih socialno-ekonomskih in epidemioloških razmer v obeh državah. Večja razhajanja pa smo ugotovili pri primerjavah časov uvedbe presejalnega testiranja krvodajalcev s testi NAT, saj so prve tovrstne preiskave v RS uvedli že leta 2000 (RNA HCV). Tudi z izvajanjem trojnih testov ID-NAT (DNA HBV, RNA HCV in DNA HIV-1) so v RS začeli prej, in sicer leta 2007, medtem ko so jih v RH uvedli leta 2013. S kronološko primerjavo prevalenc okužbe s HBV smo ugotovili, da se te v obeh državah razlikujeta. V 90-ih letih je bila prevalenca okužb s HBV med krvodajalci v RH zelo visoka, in sicer 50 primerov/ $10^5$  enot darovane krvi, kar pripisujemo predvsem velikemu številu prispelih beguncev iz BiH ter posledično povečane naseljenosti in zmanjšanju življenjske ravni na prostoru RH. Z leti pa se prevalenca zmanjšuje, predvsem zaradi uvedbe obveznega cepljenja osnovnošolcev. V primerjavi z letom 1998, se je leta 2015 prevalenca okužb s HBV bistveno zmanjšala in je v RS znašala  $3/10^5$  enot darovane krvi, v RH pa  $7/10^5$  enot darovane krvi (Graf 2).

Za primerjavo rezultatov presejalnega testiranja ID-NAT krvodajalcev smo uporabili podatke iz prvih treh let po uvedbi le-tega v obeh državah. Ugotovili smo, da so takrat odkrili večino primerov OBI. V prvem letu od uvedbe testiranja sta bili v obeh državah prevalenci OBI visoki, in sicer  $7/10^5$  darovanih enot krvi v RS (2007) in  $11/10^5$  darovanih enot krvi v RH (2013) (Graf 1). Razlog za to je, da so bili pred uvedbo testov ID-NAT na voljo le serološki testi, s katerimi pa se ne da odkriti OBI. Ugotovili smo, da se prevalenca OBI z leti zmanjšuje, zato lahko zaključimo, da smo z uvedbo presejalnega testiranja NAT krvodajalcev zagotovili varnejšo preskrbo s krvjo.

Postopke vpogleda nazaj ali postopke »look-back« izvajamo, kadar ugotovimo, da je krvodajalec, ki je večkrat daroval kri okužen s povzročitelji, ki bi se lahko s krvjo prenesli na prejemnika in škodovali njegovemu zdravju, kadar obstaja utemeljen sum, da z uporabljenim testom nismo mogli zaznati okužbe, ki bi se zato lahko prenesla na prejemnika transfuzije. Razlika v izvajanju postopkov »look-back« med državama je v tem, da se v RS sprožijo le v primerih prijav okužb, prenesenih s transfuzijo (TTI), v RH pa se izvajajo v skladu s priporočili HZTM. V RH je opazno zmanjševanje njihovega števila, in sicer z 21 leta 2013, preko 11 v letu 2014, do 7 primerov OBI leta 2015.

## **VI. SKLEP**

V nalogi smo s primerjavo zbranih podatkov za RS in RH opisali pomembnost presejalnega testiranja NAT krvodajalcev pri odkrivanju okultne okužbe s HBV (OBI). Ta predstavlja velik problem zaradi zelo nizkih, včasih celo nemerljivih količin DNA HBV v krvi okuženih oseb. S kronološko primerjavo različnih podatkov s področja transfuzijske medicine v RS in RH smo ugotovili, da:

- RS in RH spadata med države z nizko prevalenco okužb s HBV, pri čemer število prijav akutnih okužb in kroničnih prenašalcev virusa stalno upada;
- je presejalno testiranje ID-NAT vseh krvodajalcev najboljša razpoložljiva metoda za odkrivanje OBI, ki jih s serološkim presejalnim testiranjem, razpoložljivim pred tem nismo mogli odkriti;
- sta obe državi presejalno serološko testiranja krvodajalcev na prisotnost HbsAg uvedli v približno enakem časovnem okviru, najverjetneje zaradi podobnih socialno-ekonomskih in epidemioloških razmer, in da je bila v 90-ih letih prevalenca hepatitisa B med krvodajalci v obeh državah, predvsem pa v RH, ki je sprejela veliko število beguncev iz BiH, velika;
- sta obe državi uvedli testiranje NAT krvodajalcev v različnih časovnih obdobjih, in sicer RS leta 2000 najprej za določanje RNA HCV in nato leta 2007 trojni ID-NAT, za sočasno detekcijo DNA HBV, RNA HCV in DNA HIV-1, RH pa leta 2013 prav tako trojni ID-NAT, kar pomeni, da imata danes obe državi na razpolago varno kri za transfuzijsko zdravljenje; smo s primerjavo podatkov o rezultatih presejalnega testiranja krvodajalcev z metodo ID-NAT v prvih treh letih po njeni uvedbi v posamezni državi ugotovili, da je bila predvsem v prvem letu prevalenca OBI precej visoka, saj je pred tem s serološkimi testi ni bilo mogoče odkriti, danes pa je majhna;
- je razlika v izvajanju postopkov »look-back« med državama v tem, da se v RS ti postopki izvedejo le v primeru prijave okužb, za katere sumijo, da so bile prenesene s transfuzijo, medtem ko se v RH izvajajo kontinuirano, v skladu s priporočili HZTM.

## **VII. LITERATURA**

1. Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D: Interna medicina. 3. izdaja. Ljubljana: Litera picta, 2005: 589-95.
2. Burtis Carl A., R. Ashwood E, E. Bruns. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 5. izdaja, Saunders, ZDA, 2012: 1637-1693.
3. Mahoney, Burkholder, Matson: Prevention of hepatitis B virus infection. 199;47:865-74.
4. Lok, McMahon: Chronic hepatitis B. Update 2009;50:661–662 .
5. Chang et al: Hepatitis B Vaccination and Hepatocellular Carcinoma Rates in Boys and Girls. JAMA 2000;284(23):3040-3042.
6. Chu et al. : Natural history of hepatitis B e antigen to antibody seroconversion in patients with normal serum aminotransferase levels. Am J Med. 2004;116(12):829-34.
7. Manno et al.: Natural history of chronic HBV carriers in northern Italy: morbidity and mortality after 30 years. Gastroenterology. 2004;127(3):756-63.
8. Scott Mitchell G., Gronowski M. Ann in Eby S. Charles (ur.): Tietz's Applied Laboratory Medicine; Case 15 (I Did It Just Once – A 37-Year-Old Man with Hepatitis C). 2. izdaja, John Wiley & Sons, Inc., ZDA 2007; 111–120.
9. Chen et al.: Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. JAMA 2006; 295(1):65-73.
10. Yuen MF, et al.: A large population study of spontaneous HBeAg seroconversion and acute exacerbation of chronic hepatitis B infection: implications for antiviral therapy. Gut. 2003;52(3):416-9.
11. Levičnik Stezinar S, Nograšek P: Izplen presejalnega testiranja krvodajalcev s tehniko NAT v Sloveniji. Zdrav Vestn 2012; 81(2):257–64.
12. Laperche S: Blood safety and nucleic acid testing in Europe. Eurosurveillance 2005;10:1-3.

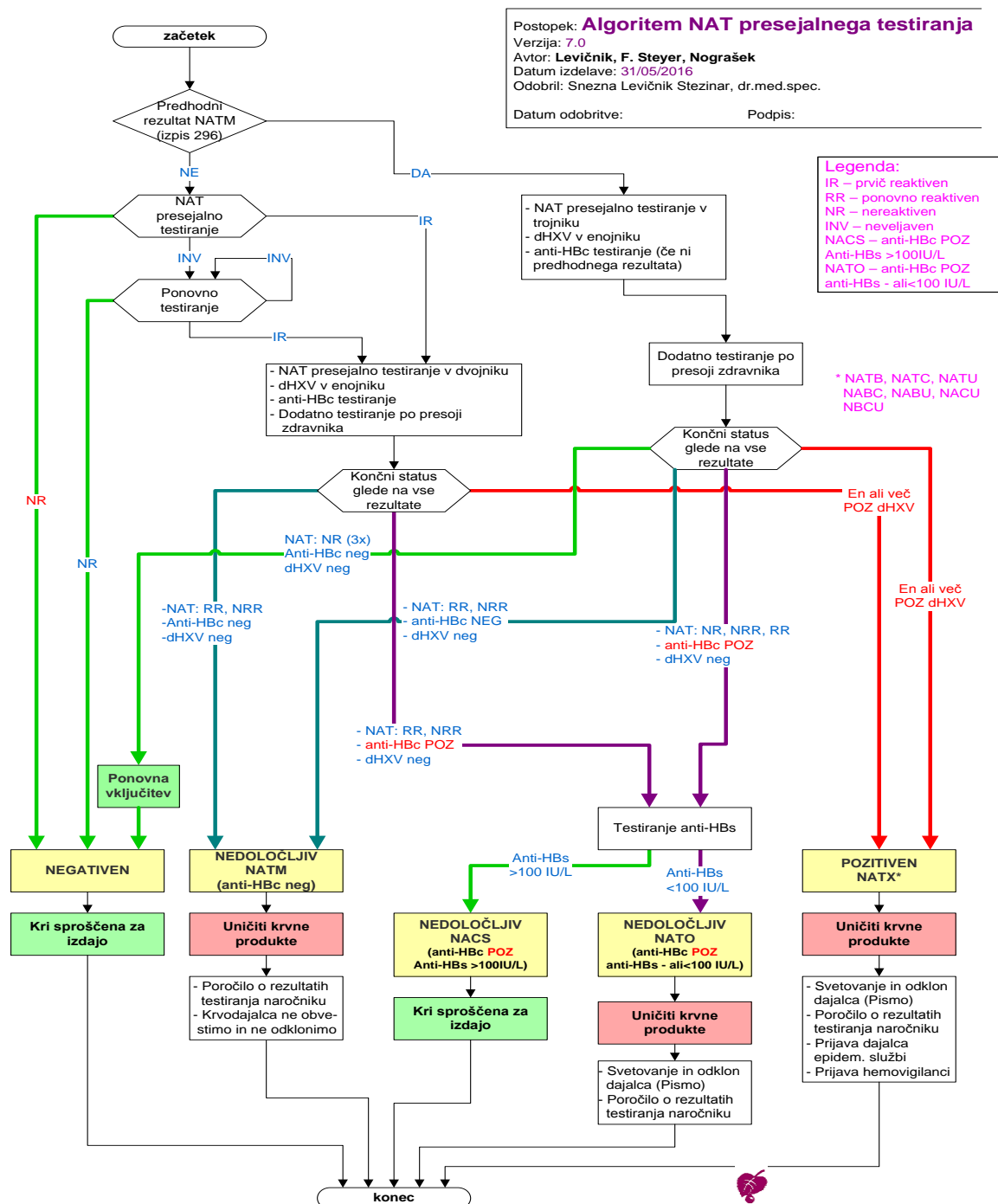
13. Van Hemert et al. : Occult hepatitis B infection: an evolutionary scenario. *Virology Journal* 2008; 5:146: 1-13.
14. Zerbini et al. : The characteristics of the cell-mediated immune response identify different profiles of occult hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 2008;134(5):1470-81.
15. Mihaljević I : Preporuke za provođenje look-back i trace-back postupka u transfuzijskoj djelatnosti RH. *HZTM* 2016; 1-4.
16. Shematski prikaz zgradbe HBV. Pridobljeno 4.4.2016, s <http://depositphotos.com/39584263/stock-illustration-diagram-of-hepatitis-b-virus.html>
17. Tipična slika serološkoga poteka akutne okužbe s HBV. Pridobljeno 4.4.2016, s <http://depts.washington.edu/hepstudy/hepB/clindx/serology/discussion.html>
18. Serološki potek kronične okužbe s HBV. Pridobljeno 4.4.2016, s <http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/hepatology/hepatitis-b/>
19. Interpretacija rezultata seroloških testiranja okužbe s HBV. Pridobljeno 4.4.2016, s <http://www.ecinsw.com.au/hepatitis-B>
20. Mihaljević I : Postupak evaluacije doza i davatelja krvi prema rezultatima NAT i seroloških testova u transfuzijskoj djelatnosti RH. *HZTM* 2015; 4-17.
21. Levičnik Stezinar: Hemovigilanca-Potransfuzijski hepatitis. *ZTM* 2005; 121-131.
22. Pollicino et al. : Molecular and functional analysis of occult hepatitis B virus isolates from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2007;45(2):277-85.
23. Lau GK : Hepatitis B reactivation after chemotherapy: two decades of clinical research. *Hepatology* 2008; 2(2): 152–162.
24. Yao, Moorman : Immune Exhaustion and Immune Senescence: Two Distinct Pathways for HBV Vaccine Failure During HCV and/or HIV Infection. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 2013; 61(3): 193-201.

25. Marcellin et al. : Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med.* 2004;351(12):1206-17.
26. Liaw YF et al.: Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med.* 2004;351(15):1521-31.
27. Tobernson,Thomas: Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 479-86.
28. Raimondo, Pollicino, Cacciola, Squadrito: Occult hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology* 2007; 46:160–170.
29. Allain: Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion. *Vox Sanguinis* 2004; 86: 83–91.
30. Lesnikar : Epidemiology of hepatitis B and C in Croatia. *Acta Med Croatica* 2005;59(5):377-81.
31. [www.nijz.si](http://www.nijz.si)
32. Fileš I: Uloga mutanata virusa hepatitisa B u liječenju kronične HBV infekcije. *FBF Zagreb*, 2015; 5-7.
33. Hoofnagle et al.: Management of hepatitis B: Summary of a clinical research workshop. *Journal of Hepatology* 2007; 45:1056–1075.
34. Rantala M, van de Laar MJ: Surveillance and epidemiology of hepatitis B and C in Europe – a review. *Euro Surveill.* 2008; 1-8.
35. Levičnik-Stezinar S., Jovanovič P : Prevalenca protiteles anti-HBc med krvodajalci v Sloveniji ter pomen pri presejalnem testiranju. *Zdrav Vestn* 2008; 77: I-187–92.

# VIII. PRILOGE

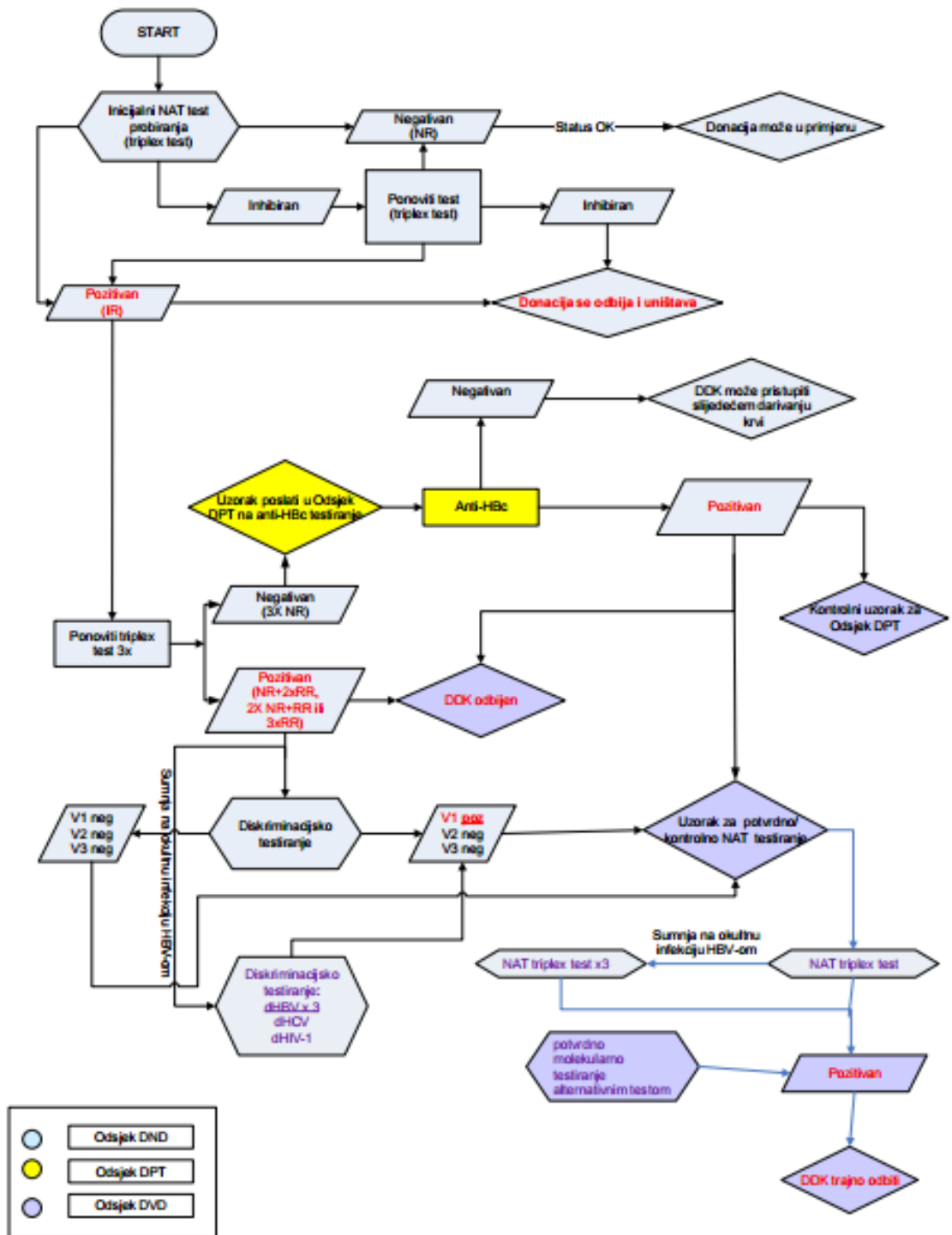
**Priloga 1:** Algoritmi presejalnega testiranja krvodajalcev z metodo NAT.

a) Algoritem presejalnega testiranja NAT, ki je v uporabi v RS.





b) Alogoritem presejalnega testiranja NAT, ki je v uporabi v RH.



## PRILOGA 2.

Algoritem evalvacije krvodajalcev s pozitivnim testom HBV-NAT in/ali pozitivnim testom na HbsAg, ki je v uporabi v RH.

