

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA ŠVIGELJ

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA
BIOMEDICINA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA ŠVIGELJ

**ZAZNAVANJE OKUŽB Z VIRUSOM ZAHODNEGA NILA PRI
KRVODAJALCIH V SLOVENIJI**

**DETECTION OF WEST NILE VIRUS INFECTION IN SLOVENIAN
BLOOD DONORS**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA
BIOMEDICINA

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino v Ljubljani, na Odseku za presejalno testiranje NAT, pod mentorstvom izr. prof. dr. Matjaža Jerasa in somentorstvom prim. Snežne Levičnik Stezinar, dr. med., spec. transf. med.

Zahvala

Zahvaljujem se svojemu mentorju izr. prof. dr. Matjažu Jerasu in somentorici prim. Snežni Levičnik Stezinar, dr. med., spec. transf. med., za vodenje in strokovne nasvete pri izdelavi magistrske naloge.

Hvala tudi Poloni Nograšek, univ. dipl. mikrobiol., za usmerjanje, praktične nasvete in pomoč pri opravljanju raziskovalnega dela. Hvala vsem zaposlenim v laboratoriju za testiranje NAT, za topel sprejem, pomoč pri pripravi vzorcev, prijaznost in potrpežljivost.

In nenazadnje, hvala družini in prijateljem za spodbudo ter spremljanje tekom študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Matjaža Jerasa in somentorstvom prim. Snežne Levičnik Stezinar, dr. med., spec. transf. med.

Janja Švigelj

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	I
KAZALO SLIK	II
KAZALO PREGLEDNIC	II
POVZETEK.....	IV
ABSTRACT	V
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
1 UVOD	1
1.1 VIRUS ZAHODNEGA NILA.....	1
1.1.1 ZGRADBA VIRUSNEGA GENOMA	1
1.1.2 PRENAŠALCI WNV	2
1.1.3 ŽIVLJENJSKI CIKEL WNV	3
1.1.4 PATOGENEZA OKUŽBE Z WNV	4
1.1.5 EPIDEMIOLOGIJA	5
1.1.6 KLINIČNA SLIKA OKUŽBE Z WNV	5
1.1.7 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE OKUŽBE	6
1.1.8 RAZŠIRJENOST WNV V SLOVENIJI IN SOSEDNJIH DRŽAVAH.....	6
1.2 SKRB ZA VARNOST KRVİ IN KRVNIH KOMPONENT	8
1.3 PRESEJALNO TESTIRANJE NAT	9
2 NAMEN DELA.....	12
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 VZORCI KRVODAJALCEV	13
3.2 KONTROLNI VZORCI	13
3.3 PRISTOP K ISKANJU IN IZBIRI VZORCEV	13
3.4 PRIPRAVA VZORCEV	14
3.4.1 LABORATORIJSKI MATERIAL IN OPREMA.....	15
3.5 TESTIRANJE VZORCEV Z AVTOMATIZIRANIM ANALIZATORJEM PROCLEIX® PANTHER.....	15
3.5.1 PRINCIP TESTA	15
3.5.2 REAGENTI.....	17
3.5.3 KALIBRACIJA.....	18
3.5.4 LABORATORIJSKA OPREMA	18
3.5.5 POTEK DELA	19
3.5.6 INTERPRETACIJA REZULTATOV	20
4 REZULTATI	22

5	RAZPRAVA	30
6	SKLEP.....	32
7	LITERATURA	33

KAZALO SLIK

Slika 1:	Shematski prikaz zgradbe genoma WNV	2
Slika 2:	Kroženje virusa WNV	3
Slika 3:	Življenjski cikel WNV	4
Slika 4:	Geografski prikaz okužb z WNV v Evropi	7
Slika 5:	Princip metode NAT	10
Slika 6:	Vzorci, pripravljeni za testiranje	14
Slika 7:	Pomnoževanje, posredovano s prepisovanjem RNA - TMA	16
Slika 8:	Reakcija kemiluminiscence z akridinijevim estrom.....	17
Slika 9:	Avtomatizirani analizator Procleix® Panther	20
Slika 10:	Primer interpretacije rezultatov.....	21
Slika 11:	Grafični prikaz krvodajalcev glede na spol.....	22
Slika 12:	Frekvenčni prikaz starosti testiranih krvodajalcev (N=3.888)	23
Slika 13:	Frekvenčni grafični prikaz števila enot krvi, ki smo jih testirali na prisotnost WNV, glede na datum njihovega odvzema (N=3.888)	24
Slika 14:	Grafični prikaz deležev testiranih vzorcev darovanih enot krvi, glede na regije, kjer so bile odvzete.....	25

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I:	Prostoživeče ptice v Sloveniji, v katerih so dokazali protitelesa proti WNV ...	2
Preglednica II:	Število okužb v Sloveniji in sosednjih državah.....	7
Preglednica III:	Obvezna serološka testiranja darovanih enot krvi v Sloveniji	9
Preglednica IV:	Obvezno testiranje NAT darovanih enot krvi v Sloveniji.....	9
Preglednica V:	Priprava reagentov	19
Preglednica VI:	Rezultati testiranja NAT krvodajalcev s Primorske	26
Preglednica VII:	Rezultati testiranja NAT krvodajalcev z Dolenjske	27
Preglednica VIII:	Rezultati testiranja NAT krvodajalcev s Štajerske.....	27

Preglednica IX: Rezultati testiranja NAT krvodajalcev iz Osrednje Slovenije.....	28
Preglednica X: Rezultati testiranja NAT krvodajalcev z Gorenjske.	28
Preglednica XI: Zaznavanje RNA WNV s testom Procleix [®] Panther WNV v različnih razredčinah kontrolnega vzorca.....	29

POVZETEK

Okužbe z virusom Zahodnega Nila (WNV – ang. West Nile Virus) lahko povzročijo bolezen in vročico Zahodnega Nila, ta pa se nato lahko razvije v meningitis in encefalitis. Virus so prvič odkrili v Ugandi, kasneje pa se je razširil po Afriki, v Azijo, Evropo in nazadnje tudi v Ameriko. Virus se na človeka in živali prenaša s piki okuženih komarjev vrst *Culex* ali *Aedes*. Njegovi naravni viremični gostitelji so ptice. Izbruhi okužb so značilni za mesece z veliko dejavnostjo komarjev, torej za julij, avgust in september. Virus se lahko prenaša tudi preko materinega mleka, darovanih organov ter transfuzij krvi in krvnih pripravkov. Tako predstavlja tudi možno tveganje za varno preskrbo s krvjo. Večina okužb ljudi poteka brez simptomov, zato je nevarnost za prenos WNV s transfuzijami še toliko večja. Do sedaj se prenos virusa in s tem varnost krvi zagotavlja z odklanjanjem krvodajalcev 28 dni po potovanju in bivanju v državah, kjer je prisoten Virus Zahodnega Nila.

V Sloveniji smo že dokazali en primer okužbe z Virusom Zahodnega Nila v letu 2013. Izbruhi se pojavljajo v sosednji Italiji in Hrvaški. Za zagotovitev varnosti krvi so v Italiji že vpeljali obvezno testiranje NAT na prisotnost nukleinskih kislin WNV v tistih provincah, kjer se pojavljajo dokazane okužbe v obdobju med 15. julijem in 30. septembrom. V okviru magistrske naloge smo preverili stanje (ne)okuženosti z WNV krvodajalcev v Sloveniji. S postopkom NAT smo testirali vzorce enot krvi, darovane v času med 29. julijem in 11. septembrom leta 2015. Testirane krvodajalce smo razdelili na pet geografskih skupin, glede na področje odvzema krvi in sicer na: Primorsko, Dolenjsko, Štajersko, Osrednjo Slovenijo in Gorenjsko. Najbolj sta nas zaradi bližnjega epidemiološkega stanja v Italiji in na Hrvaškem zanimali Primorska in Dolenjska. Vzorce krvi smo zbrali iz arhiva, ki ga hranijo na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino v Ljubljani. Nato smo vsak posamezni plazemski vzorec krvodajalcev testirali na analiznem sistemu Procleix[®] Panther, z metodo pomnoževanja RNA, posredovanega z njenim prepisovanjem.

Tako smo testirali 1.517 vzorcev odvzetih enot krvi na Primorskem, 1.428 na Dolenjskem, 343 na Štajerskem, 309 v Osrednji Sloveniji in 197 na Gorenjskem, skupaj torej 3.888. Čeprav virusa nismo zaznali v nobenem preiskovanem vzorcu, pa menimo, da je potreben občasen nadzor nad morebitnimi posledicami epidemičnih pojavov v naši bližini in seveda pripravljenost za hitro uvedbo presejalnega testiranja na prisotnost WNV tudi pri nas.

KLJUČNE BESEDE: kri, krvodajalci, virus Zahodnega Nila (WNV), testiranje NAT, test Procleix[®] WNV

ABSTRACT

The West Nile virus (WNV) is causing West Nile disease and fever, which can further develop into meningitis and encephalitis. It was first discovered in Uganda. Later it spread to Africa, Asia, Europe, and finally to Americas. The virus is transmitted to humans and animals via bites of infected mosquitos (*Culex* or *Aedes* species). The natural viremic hosts of WNV are birds. Infection outbreaks in humans are typically occurring in periods with the highest mosquito activity, i.e. between July and September. Virus can also be transmitted to humans by breast milk, organ transplants and blood transfusions. Therefore it presents a potential threat to the safety of blood supply. As most infections in humans are asymptomatic, the risk of WNV transmission by infected blood transfusion is high. Up to now, in Slovenia, blood safety is ensured by deferral of blood donors who have lived or traveled in countries with outbreaks of WNV, 28 days before donation. In Slovenia, up to now, there was just one case of WNV infection confirmed in 2013. However outbreaks of WNV infections are quite frequent in our neighbouring countries, Italy and Croatia, in areas that very close to us. In order to ensure the safety of blood supplies in Italy, WNV NAT screening was initiated in provinces where cases of WNV during the period between July 15 and September 30 are often reported. The aim of our work was to determine the prevalence of acute WNV infections among regionally groups of blood donors in Slovenia. For this purpose, we screened samples of blood units donated within the period between July 29 and September 11, 2015. Blood donors tested were grouped into five geographic regions according to the sites of blood donation and residency, i.e. Primorska, Dolenjska, Štajerska, central Slovenia and Gorenjska region. The most important regions for our study were those of Primorska and Dolenjska, as they are situated nearby epidemiological sites in Italy and Croatia. Plasma samples of selected individual blood donors were taken from the archive seroteque at the Blood Transfusion Centre of Slovenia and tested on the fully automated Procleix[®] Panther System, using transcription mediated amplification (TMA) method.

In total, 3.888 individual samples were tested, i.e. 1.517 originating from Primorska, 1.428 from Dolenjska, 343 from Štajerska, 309 from central Slovenia and 197 from Gorenjska. All of them were found to be negative or nonreactive. However we think that both periodical epidemiological surveillance and of course preparedness to implement WNV NAT screening immediately when needed, are necessary.

KEY WORDS: blood, blood donors, West Nile virus (WNV), NAT testing, Procleix[®] WNV assay

SEZNAM OKRAJŠAV

ang.	angleško
anti-HCV	protitelo proti virusu hepatitisa C
cDNA	komplementarna DNA (ang. complementary DNA)
CTD	Center za transfuzijsko dejavnost
CTM	Center za transfuzijsko medicino
CŽS	centralni živčni sistem
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. Deoxyribonucleic Acid)
ECDC	Evropski center za nadzor nalezljivih bolezní (ang. European Centre for Disease Prevention and Control)
HBsAg	plašni antigen virusa hepatitisa B (ang. Hepatitis B surface antigen)
HIV-1/HIV-2	virus človeške imunske pomanjkljivosti tipa 1 in 2 (ang. Human Immunodeficiency Virus type 1 and 2)
ID NAT	individualni vzorec za testiranje NAT (ang. Individual Donation NAT)
MP NAT	mini zlivki vzorcev za testiranje NAT (ang. Mini Pool NAT)
mRNA	informacijska RNA (ang. Messenger RNA)
NAT	testiranje na prisotnost virusnih nukleinskih kislin (ang. Nucleic Acid Testing)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction)
Protein C	protein kapside (ang. capsid protein)
Protein E	protein ovojnice (ang. envelope protein)
Protein prM	membranski protein (ang. membrane protein)
RNA	ribonukleinska kislina (ang. Ribonucleic Acid)
RLU	relativna emisija svetlobe (ang. Relative Light Units)
ssRNA	enovijačna RNA (ang. single stranded RNA)
(+)ssRNA	pozitivna enovijačna RNA
(-)ssRNA	negativna enovijačna RNA
S/CO	razmerje med signalom in mejno vrednostjo analita (ang. Signal to Cut off Ratio)
TCR	reagent, ki se veže na tarčni analit (ang. Target Capture Reagent)
TMA	pomnoževanje, posredovano s prepisovanjem RNA (ang. Transcription Mediated Amplification)
ZTM	Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

ZPKrv-1

Zakon o preskrbi s krvjo

WNV

virus Zahodnega Nila (ang. West Nile Virus)

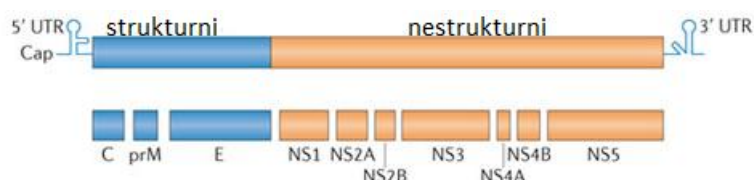
1 UVOD

1.1 VIRUS ZAHODNEGA NILA

Virus Zahodnega Nila (WNV) so prvič odkrili leta 1937 v krvi bolnice z vročinsko boleznijo, z območja Zahodnega Nila v Ugandi. Uvrščamo ga v rod flavivirusov, družine *Flaviviridae*. Gre za pozitivno polaren enovijačni RNA-virus z ovojnico premera 50 nm. Sodi v serološki kompleks japonskega encefalitisa. Prenaša se s komarji ter povzroča vročico Zahodnega Nila in encefalitis (1). WNV delimo v pet samostojnih genskih skupin (2). Okužbo pri ljudeh povzročata dve, in sicer skupini 1 in 2. Gensko skupino 1 WNV so našli v Afriki, na Bližnjem vzhodu, v Indiji, Evropi, Severni, Srednji in Južni Ameriki ter v Avstraliji. Skupina 2 pa je prisotna v podsaharski Afriki in na Madagaskarju (3).

1.1.1 ZGRADBA VIRUSNEGA GENOMA

Virusni delci WNV so okrogle, ikozaedrične oblike. Nukleokapsido obdaja lipidna ovojnica, ki ščiti virusni genom pred celičnimi nukleazami (4). Genom WNV predstavlja pozitivna enovijačna molekula RNA [(+)ssRNA], sestavljena iz približno 11.000 nukleotidov. Nosi zapis za tri strukturne in sedem nestrukturnih proteinov (Slika 1). Strukturni so proteini kapside (C), membrane (prM) in ovojnice (E), nestrukturni pa NS1, NS2A, NS4A, NS3, NS4A, NS4B in NS5. Protein C tvori nukleokapsido, protein E je odgovoren za vezavo specifičnih receptorjev na tarčne molekule ter za vstop in izstop virusa v celici, protein prM pa je predhodnik strukturnega proteina M. Ta omogoča v nezrelih virionih pravilno zvijanje proteina E in s tem prepreči prezgoden izstop nezrelega virusa iz celic. Nestrukturni proteini imajo veliko še neraziskanih vlog. Vemo, da sodelujejo pri pomnoževanju ssRNA ter zavirajo prirojeni imunski odziv po virusni okužbi (1). Na 5' koncu genoma se nahaja kratko nekodirajoče področje, ki mu sledi en sam bralni okvir, temu pa na 3' koncu še eno kratko nekodirajoče področje. Obe nekodirajoči področji tvorita stabilno lasnično zanko. Ta ima na 5' koncu t.i. kapo, ki ščiti prepoznavno mesto za ribosom in celotno molekulo mRNA pred delovanjem eksonukleaz. Na 3' koncu genom nima repa poliA (1, 3).



Slika 1: Shematski prikaz zgradbe genoma WNV. Kodirajoče področje vsebuje zapis za 7 nestrukturnih in 3 strukturne proteine. Na 5' koncu ima t.i. kapo, na 3' koncu pa nima repa poliA (5).

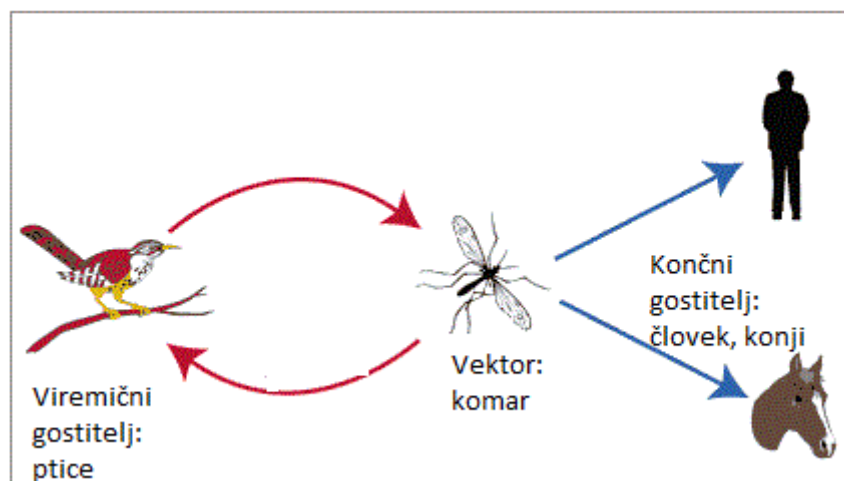
1.1.2 PRENAŠALCI WNV

WNV se na človeka prenese s pikom okuženih komarjev iz rodov *Culex* in *Aedes*. Naravni virusni rezervoar so prostoživeče ptice, ki so glavni viremični gostitelj in lahko s selitvijo prenašajo virus na nova območja. V Sloveniji so izvedli raziskavo o prisotnosti in razširjenosti WNV pri pticah. V serumskih vzorcih prostoživečih ptic pevk (Preglednica I) so ugotavljali prisotnost specifičnih protiteles proti virusu. Protitelesa proti WNV so med drugim dokazali tudi v mestnih golobih in domačih fazanih (6).

Preglednica I: Prostoživeče ptice v Sloveniji, v katerih so dokazali protitelesa proti WNV. Povzeto po (7).

Slovensko ime	Latinsko ime
taščica	<i>Erithacus rubecula</i>
mlinarček	<i>Sylvia curruca</i>
vrtna penica	<i>Sylvia borin</i>
rjava penica	<i>Sylvia communis</i>
bičja trstnica	<i>Acrocephalus schoenobaenus</i>
rumeni vrtnik	<i>Hippolais icterina</i>
lišček	<i>Carduelis carduelis</i>

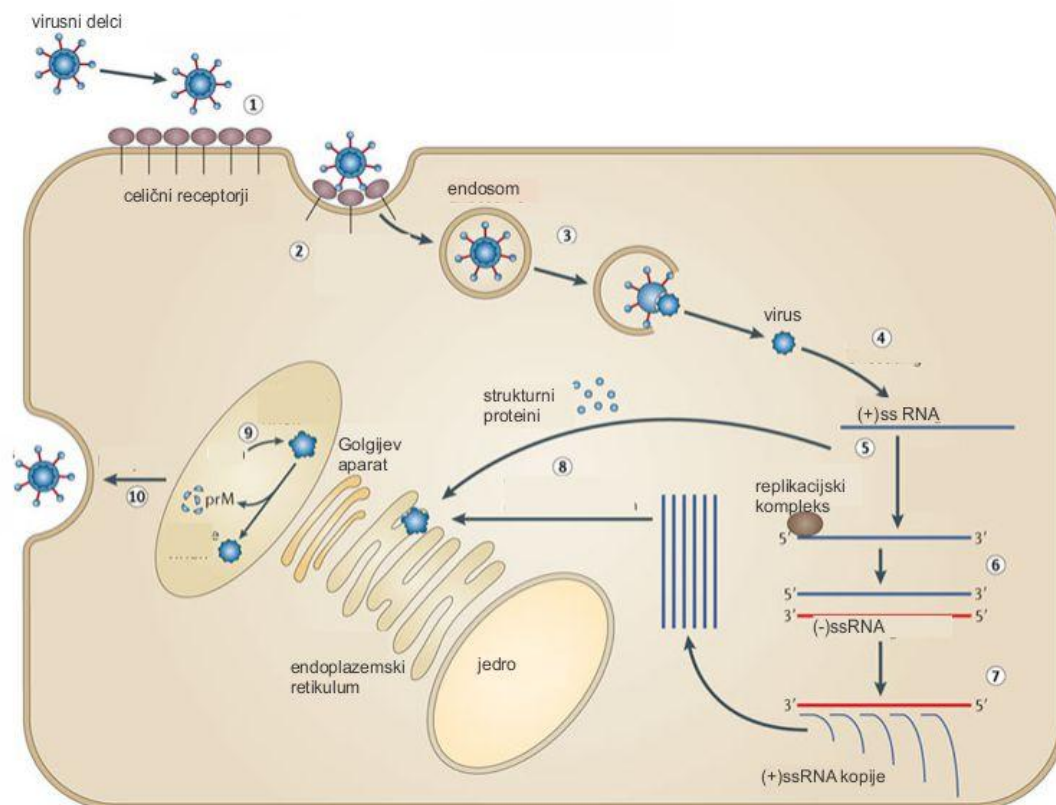
S sesanjem krvi okužene ptice se z virusom okužijo komarji, ki ga nato lahko prenesejo v človeka in živali, predvsem konje (Slika 2). Ljudje in konji so končni gostitelji WNV, pri čemer lahko razvijejo tudi klinične znake bolezni. Koncentracije virusov v krvi sesalcev so prenizke, da bi se pri sesanju njihove krvi komarji lahko okužili. WNV se s piki komarjev prenaša na številne vrste ptic, ki nato širijo okužbo na druge komarje. Prenos okužbe med ljudmi je možen tudi preko transfuzije krvi in njenih komponent ter preko darovanih organov. Prav tako sta možna prenosa okužbe z matere na plod in preko materinega mleka na novorojenčka (2).



Slika 2: Kroženje virusa WNV. Naravni rezervoar virusa so ptice. Bolezen na človeka in živali prenašajo komarji s sesanjem krvi. Človek in konj sta končni gostitelji, saj je koncentracija virusa v krvi sesalcev prenizka, da bi se komarji lahko okužili s sesanjem njihove krvi. Komarji pa lahko prenašajo virus iz okuženih na nove vrste ptic. Povzeto po (8).

1.1.3 ŽIVLJENJSKI CIKEL WNV

Življenjski cikel WNV (Slika 3) se prične z vezavo virusa na specifične receptorje, izražene na površini celic gostitelja. Sledi vstop virusa v tarčno celico z receptorsko posredovano endocitozo. Zaradi nizke vrednosti pH v endosomu se virus najprej zlije z membrano endosoma, kar povzroči slačenje zunanje virusne ovojnice. V citoplazmo se tako sprosti gola pozitivna enovijačna RNA [(+)ssRNA], ki služi kot mRNA in se prepíše v en sam poliprotein. Ta vsebuje tako strukturne kot nestrukturne proteine. Ob delovanju celičnih in virusnih proteaz se poliprotein razcepi na posamezne proteine. Oblikovanje posameznih med njimi poteka na endoplazemskem retikulumu (ER). Virusna RNA služi tudi kot matrica za sintezo komplementarne negativne enovijačne RNA [(-)ssRNA]. Pri tem sodelujejo nestrukturni virusni proteini. Nastala komplementarna (-)ssRNA pa predstavlja matrico za sintezo kopij genomske virusne RNA. Novonastale, pomnožene molekule (+)ssRNA se lahko nato vgradijo v novo nastajajoče virione ali pa delujejo kot matrice za sintezo negativno polarnih molekul (-)ssRNA. Sestavljanje virusnih delcev oz. virionov poteka na membrani endoplazemskega retikuluma. Virione tvori molekula (+)ssRNA in strukturni proteini. Protein C pa nato tvori še nukleokapsido. Nezreli virusni delci potujejo po Golgijevem aparatu, kjer pride do glikozilacije proteina E in cepitve proteina prM v zreli protein M. Cepitev proteina prM povzroči konformacijsko spremembo proteina E, kar omogoči zlitje prenosnih mešičkov z gostiteljevo celično membrano. Tako se zreli virioni z eksocitozo sprostijo iz celice (1, 7, 9).



Slika 3: Življenjski cikel WNV. 1 – virus prepoznajo receptorji na tarčni celici; 2 – virus vstopi v tarčno celico z receptorsko posredovano endocitozo; 3 – nizka vrednost pH v endosomu povzroči zlitanje virusa z endosomsko membrano in sláčenje virusne ovojnice; 4 – virusna genomska molekula ssRNA se sprostí v citoplazmo celice; 5 – prične se pomnoževanje genoma WNV; 6 – virusna RNA služi kot matrica za sintezo komplementarne (-)ssRNA; 7 – iz molekul (-)ssRNA nastanejo kopije genomske RNA WNV; 8 – na membrani endoplazmatskem retikulumu poteka sestavljanje virusnih delcev iz strukturnih proteinov, 9 – zorenje virusa, 10 – zreli virusi se z eksocitozo sprostijo iz celice. Povzeto po (5).

1.1.4 PATOGENEZA OKUŽBE Z WNV

Komarji se s sesanjem krvi viremičnega gostitelja okužijo z WNV. Virus okuži njihove črevesne epiteljske celice in se v njih pomnoži. Nato prestopi skozi steno prebavil v hemolimfo in se pomnožuje v različnih tkivih komarja, tudi v žlezah slinavkah. Kopičenje virusa v žlezah slinavkah povzroča obsežno viremijo. Okuženi komar nato s sesanjem krvi gostitelja preko sline prenese virus v mesto vboda. WNV se začne pomnoževati v keratinocitih ter Langerhansovih in dendritičnih celicah kože. Okužene kožne dendritične celice potujejo v bližnje bezgavke, od koder se WNV preko limfe razširi v gostiteljev krvni obtok, kar povzroči viremijo. WNV lahko preide tudi v centralni živčni sistem, kjer izzove okvaro živčevja. Kako virus prestopi krvno-možgansko pregrado še ni natančno pojasnjeno. Vdor virusa v centralni živčni sistem naj bi potekal na štiri domnevne načine. Prvi mehanizem naj bi predstavljal okužba endotelijskih celic možganskih kapilar. Drugi možni način naj bi

temeljlil na povečani prepustnosti krvno-možganske pregrade zaradi izločanja določenih citokinov, kar naj bi omogočalo neposreden prehod virusa v CZS. Tretji možni mehanizem prenosa WNV v CZS naj bi omogočali okuženi makrofagi, zadnji, četrti pa opisujejo kot retrogradni aksonski prenos virusa z okuženih perifernih nevronov. WNV okuži predvsem nevrone v sivi možganovini, hrbtenjači in možganskem deblu. Okužba nevronov pa lahko vodi v paralizo (2).

1.1.5 EPIDEMIOLOGIJA

Po prvem odkritju WNV so se izbruhi okužb najprej začeli pojavljati na Bližnjem vzhodu. Prvi večji epidemični pojav tovrstne okužbe, ki se je končala s smrtjo bolnika, so opisali leta 1957 v Izraelu. Ponovni obilnejši izbruhi so se nato pojavili šele trideset let kasneje. Ugotovili so, da je bila zanje odgovorna skupina 1 WNV. O pojavljanju okužb v teh letih so poročali tudi v Egiptu (10). Kasneje, po letu 1990, pa so se pričeli izbruhi pojavljati v Evropi. Največ okužb so zabeležili v Romuniji in sredozemskih državah, posamezne primere so zaznali tudi v južni Rusiji. Sprva so vse izbruhe v Evropi pripisali genski skupini 1 WNV, v zadnjih desetih letih pa so dokazali tudi kroženje skupine 2, in sicer v Italiji, Rusiji, Grčiji in Romuniji. Leta 1999 je virusna okužba izbruhnila v New Yorku in se nato razširila proti zahodu Združenih držav Amerike. V naslednjih letih se je WNV razširil po celotni Severni, Srednji in Južni Ameriki.

Izbruhi bolezni se pojavljajo na območjih s primernim številom ptic kot viremičnih gostiteljev in s sočasno veliko dejavnostjo komarjev. WNV so našli v več kot 60 različnih vrstah komarjev. Za kroženje virusa v Evropi je najpomembnejši komar vrste *Culex pipiens*. Ptice selivke pa prenašajo virus na nova območja in tako širijo okužbo. Okužba doseže vrhunec med julijem in oktobrom, zato največ izbruhov zaznajo v obdobju med koncem julija in sredino septembra. Na njihovo pojavnost vpliva torej dejavnost komarjev, ta pa je odvisna od temperature okolja, padavin in splošnega podnebja (11).

1.1.6 KLINIČNA SLIKA OKUŽBE Z WNV

V večini primerov, po vbodu komarja, okuženega z WNV in prenosu virusa na človeka, poteka okužba brez simptomov, saj kar 80% okuženih ljudi ne zboli. Klinični znaki pri preostalih 20% pa so blagi in podobni gripi: glavobol, povišana telesna temperatura, bolečine v mišicah, utrujenost in slabo počutje. Pojavijo se lahko tudi težave s prebavili in kožni izpuščaji. Inkubacijska doba pred izbruhom vročice traja od 4 do 12 dni (2).

Pri manj kot 1% primerov se razvije nevroinvazivna oblika bolezni, in sicer encefalitis, meningitis ali poliomyelitis. Prizadetost CZŠ se odraža z visoko vročino, glavobolom, otrdelostjo vratu, zmedenostjo, tresenjem, krči, šibkostjo mišic in ohromelostjo. Potek bolezni je lahko različen, in sicer od blagih znakov do hudega encefalitisa, ki se lahko konča s komo in smrtjo. Smrtnost pri bolnikih, ki razvijejo nevroinvazivno obliko bolezni, je 10%.

Tveganje za razvoj nevroinvazivne oblike bolezni narašča s starostjo bolnika in je pogostejše pri imunsko oslabljenih osebah. Veliko tveganje za razvoj težjih nevroloških bolezni imajo tudi bolniki, ki se z WNV okužijo po presaditvi darovanega organa.

Vročica, ki jo izzove WNV lahko traja le nekaj dni, nato pa večina bolnikov popolnoma okreva. Pri nekaterih okuženih osebah pa lahko utrujenost in slabotnost trajata še nekaj tednov ali mesecev. Okrevanje po prizadetosti CZŠ lahko traja več tednov ali mesecev. Polovica bolnikov ima po preboleli okužbi nevroinvazivne oblike bolezni dolgotrajne posledice, ki se kažejo v obliki utrujenosti, težav s koncentracijo in slabega spomina (10).

1.1.7 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE OKUŽBE

Specifičnega zdravljenja bolezni Zahodnega Nila ni, zato poteka le simptomatsko in podporno. Pri hujši obliki bolezni je nujno potrebna hospitalizacija.

Cepiva za preprečevanje okužb pri ljudeh ni. Zato je nujno nadzorovanje populacij komarjev ter hitro odkrivanje novih izbruhov okužb. Na endemičnih območjih v času sezone aktivnosti komarjev priporočajo uporabo zaščitnih mrež, repelentov in nošenje svetlih oblačil. Preprečevanje razmnoževanja komarjev vključuje tudi odstranjevanje stoječih voda v bližini bivališč (2). Na območjih, kjer je kroženje virusa izrazito, pa je potrebno tudi presejalno testiranje darovanih enot krvi in organov.

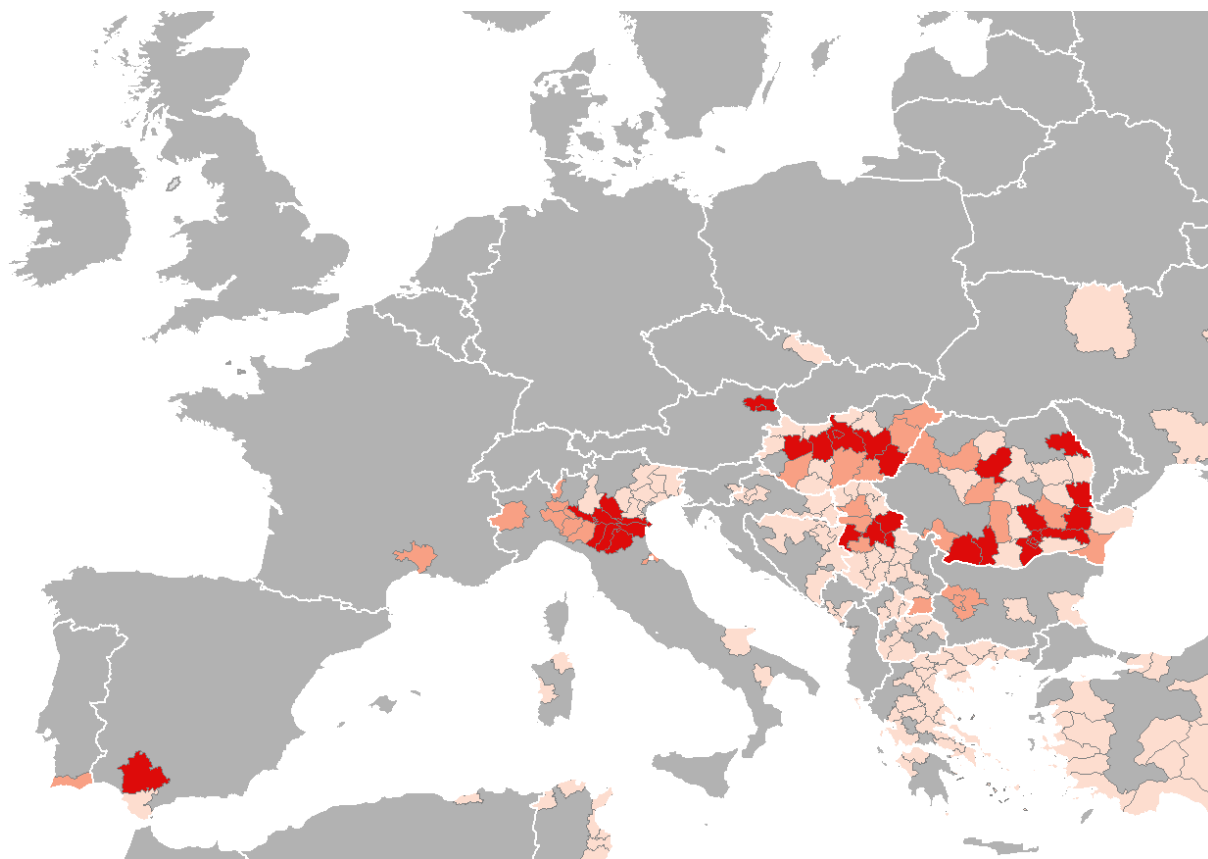
1.1.8 RAZŠIRJENOST WNV V SLOVENIJI IN SOSEDNIH DRŽAVAH

Slovenija je uvrščena v območje z možnostjo pojava okužbe z WNV, saj pri nas naravne danosti v okolju omogočajo obstoj komarjev *Culex pipiens*. Prisotnosti virusa v komarjih pri nas še niso dokazali, potrdili pa so jo v prostoživečih pticah. Dokazali so tudi en primer bolnika okuženega z WNV, in sicer v avgustu leta 2013 (12). V vseh državah, ki mejijo na Slovenijo, so v vsaj eni od zadnjih šestih sezon potrdili pojav in kroženje WNV. Dokazane primere okužb z WNV pri ljudeh beleži, nadzira in spremlja Evropski center za nadzor nalezljivih bolezni ECDC (ang. European Centre for Disease Prevention and Control). Ta tedensko objavlja podatke o primerih okužb, in sicer vse od maja pa do novembra (Slika 4). Vročico Zahodnega Nila so leta 2012 dokazali blizu slovensko-italijanske meje, v pokrajinah

v okolici Vidma, Gorice in Benetk, leta 2013 pa blizu slovensko-hrvaške meje, na področju občine Zagreb (Preglednica II). Slovenija sodi po klasifikaciji ECDC v območje, ki je v nevarnosti, saj so vzpostavljeni ustrezni okoljski pogoji za kroženje WNV, dokazana pa je že tudi bila okužba človeka z WNV (13, 14).

Preglednica II: Število okužb v Sloveniji in sosednjih državah. Povzeto po (14).

Država	Leto 2012	Leto 2013	Leto 2014	Leto 2015
	Število primerov odkritih okužb z WNV			
Avstrija	0	0	1	7
Hrvaška	5	16	0	0
Italija	50	69	24	61
Madžarska	17	31	11	18
Slovenija	0	1	0	0



Slika 4: Geografski prikaz okužb z WNV v Evropi.

Primeri okužb **v tekočem letu**, **prejšnji sezoni**, **zgodnejši sezoni**. Območja, kjer še niso zaznali okužb z WNV. Zemljevid je bil objavljen 25. avgusta 2016, na spletni strani ECDC. Povzeto po (14).

1.2 SKRB ZA VARNOST KRVNI IN KRVNIH KOMPONENT

V Sloveniji krvodajalci kri darujejo prostovoljno, brezplačno in anonimno (15). Naloga transfuzijske medicine je, da zagotovi zadostne količine varne in ustrezne krvi, s čimer prejemnikom zagotavlja kar najboljše možno zdravljenje s krvjo. Varnost in kakovost krvnih pripravkov v Sloveniji predpisuje Zakon o preskrbi s krvjo (ZPKrv, Ur.l. RS, št. 104/2006). V njem so opredeljena merila za izbiro varnih krvodajalcev ter predpisana določila za testiranja darovanih enot krvi, namenjenih izdelavi krvnih pripravkov. S transfuzijo krvi se lahko prenašajo različni povzročitelji bolezni. Ti lahko v prejemnikih sprožijo bolezni, ki imajo v nekaterih primerih hude posledice, celo smrt. Darovane krvi seveda ne moremo testirati na vse možne povzročitelje bolezni, zato ugotavljamo prisotnost le tistih virusov in drugih patogenov, ki se v splošni populaciji in na določenem območju razmeroma pogosto pojavljajo. V Sloveniji tako vsako darovano enoto krvi testiramo na viruse človeške imunske pomanjkljivosti (HIV), hepatitisa B (HBV) in C (HCV) ter na bakterijo *Treponema pallidum*, povzročiteljico sifilisa. Obseg obveznega testiranja določa Pravilnik o obveznem testiranju krvi in komponent krvi. Tudi virus Zahodnega Nila je patogeni organizem, ki se lahko prenaša s transfuzijo krvi. Zagotavljanje varnosti krvi brez prisotnosti WNV trenutno omogočamo z ozaveščanjem in zavračanjem krvodajalcev, ki predstavljajo morebitno tveganje. Pred odvzemom krvi morajo namreč vsi krvodajalci izpolniti vprašalnik, s pomočjo katerega ugotavljamo njihovo primernost. V času sezone aktivnosti komarjev obvezno odklonimo vse tiste krvodajalce, ki so do 28 dni pred darovanjem krvi bivali ali potovali na območjih, kjer je prisoten WNV (15).

Varnost krvi za transfuzijo torej zagotavljamo z zdravimi in ozaveščenimi krvodajalci in s presejalnim testiranjem darovanih enot (16). Cilj vsakega presejalnega programa je, da na osnovi posrednega ali neposrednega ugotavljanja morebitne prisotnosti povzročitelja okužb v odvzetih enotah krvi, iz nadaljnje uporabe izločimo vse tiste, ki so okužene ter tako preprečimo prenos širjenja okužbe z darovalca na prejemnika. V Sloveniji vsako odvzeto enoto krvi testiramo na označevalce okužb s posrednimi serološkimi testi (Preglednica III) in z neposredno molekularno biološko metodo določanja virusnih nukleinskih kislin (NAT). Serološke presejalne teste izvajamo z encimsko-imunsko in kemiluminiscentno-imunsko metodo.

Preglednica III: Obvezna serološka testiranja darovanih enot krvi v Sloveniji. Povzeto po (17).

Ugotavljanje okužbe	Označevalec
virus hepatitisa B	antigen hepatitisa B (HBsAg)
virus hepatitisa C	protitelesa proti virusu hepatitisa C (anti-HCV)
HIV	protitelesa proti virusu HIV-1 in virusu HIV-2 (anti –HIV-1/HIV-2)
povzročitelj sifilisa (<i>Treponema pallidum</i>)	protitelesa proti bakteriji <i>Treponema pallidum</i> (anti- <i>Treponema pallidum</i>)

S presejalnim testiranjem z metodo NAT zagotavljamo visok nivo varnosti in kakovosti odvzete krvi, saj z njim neposredno ugotavljamo prisotnost virusov. Uporaba metode NAT omogoča specifično pomnoževanje in zaznavanje zelo majhnih količin virusne nukleinske kisline, zato se močno zmanjša diagnostično okno. Virusno nukleinsko kislino lahko namreč zaznamo mnogo prej kot posredne označevalce okužb (protitelesa) s serološkimi testi (18, 19). Na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (ZTM) v Ljubljani izvajajo testiranje z metodo NAT pri vseh v Sloveniji darovanih enotah krvi in sicer na prisotnost DNA virusa hepatitisa B, RNA virusa hepatitisa C ter RNA virusa človeške imunske pomanjkljivosti tipa 1 in 2. Z visoko občutljivo, specifično, enostavno, hitro in avtomatizirano metodo NAT lahko določamo tudi prisotnost nukleinske kisline WNV, vendar pa tovrstno testiranje še ne sodi v presejalni program v Sloveniji.

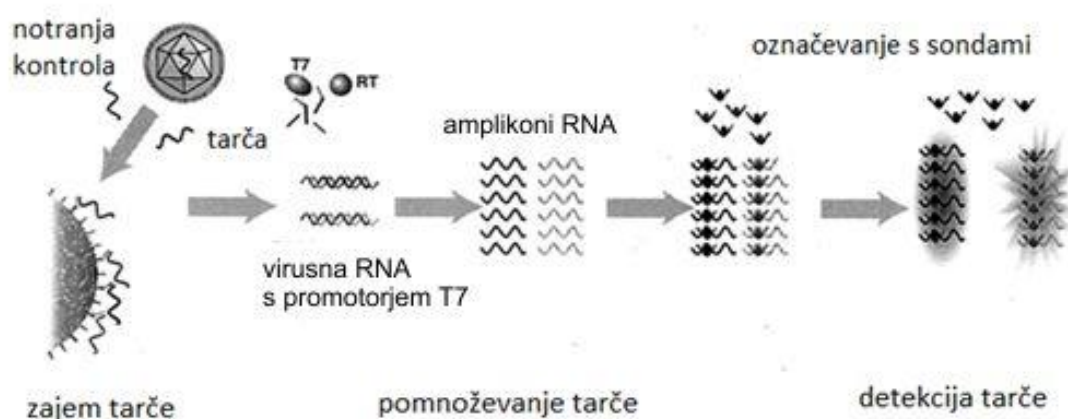
1.3 PRESEJALNO TESTIRANJE NAT

Testiranje NAT omogoča izvajanje testov tako v zlivkih oz. »pool-ih« bioloških vzorcev več preiskovancev (MP NAT) kot v individualnih vzorcih (ID NAT). V Sloveniji smo leta 2007 uvedli obvezno sočasno presejalno testiranje NAT individualnih vzorcev vse darovane krvi na prisotnost RNA HIV-1 in HIV-2, DNA HBV in RNA HCV (20). Analizni sistem, ki je v uporabi, je popolnoma avtomatiziran.

Preglednica IV: Obvezno testiranje NAT darovanih enot krvi v Sloveniji.

Virus	Tarčna molekula
Virus človeške imunske pomanjkljivosti (HIV)	RNA HIV-1, RNA HIV-2
Virus hepatitisa B	DNA HBV
Virus hepatitisa C	RNA HCV

Viruse v vzorcu najprej liziramo z detergenti (Slika 5), da sprostimo tarčno virusno molekulo RNA/DNA. Nato s posebnimi lovilnimi sondami virusno nukleotidno zaporedje vežemo na magnetne delce. Virusni genom specifično pomnožimo in ga zaznamo s kemiluminiscenco (21). Za pomnožitev virusne nukleinske kisline uporabimo verižno reakcijo s polimerazo (PCR) in transkripcijsko amplifikacijo (TMA).



Slika 5: Princip metode NAT. Najprej liziramo virus in s tem sprostimo npr. virusno RNA. Posebne lovilne sonde se specifično vežejo na virusni genom in notranjo kontrolo testa ter ju pripnejo na magnetne mikrokroglice. Tarčna virusna RNA se pomnoži z metodo TMA, pri čemer nastanejo njene kopije oz. amplikoni, na katere vežemo označene sonde, ki jih nato zaznamo s kemiluminiscenco. Povzeto po (22).

Metoda NAT je kvalitativna, in kot smo že omenili, lahko z njo določamo tudi prisotnost skupin 1 in 2 WNV. Zaznavanje RNA WNV z metodo NAT so razvili v ZDA, potem, ko so leta 2002 poročali o prvem prenosu tega virusa s transfuzijo okužene krvi. Prejemniki so se okužili po prejemu plazme, trombocitov in eritrocitov. Takrat je Uprava ZDA za hrano in zdravila (ang. Food and Drug Administration – FDA) prosila proizvajalce presejalnih testov krvi, naj razvijejo še test NAT za WNV (18). Sprva je ta omogočal testiranje v zlivkih vzorcev 6 do 24 krvodajalcev, vendar pa je metoda zaradi majhnih količin RNA WNV v preiskovanih vzorcih, ki so bile pod mejo zaznavnosti, dajala lažno negativne rezultate. Leta 2003 so namreč v ZDA poročali o kar šestih prenosih okužbe z WNV s transfuzijo krvi, ki so jo predhodno testirali z metodo NAT v zlivkih. Zato so razvili bolj občutljive teste za ugotavljanje prisotnosti RNA WNV v individualnih vzorcih darovane krvi (23, 24). Priporočajo, da naj teste MP NAT nadomestimo s testi ID NAT takoj, ko se odkrije nov primer okužbe v nevroinvazivni obliki pri splošni populaciji ali ko z MP NAT potrdimo vsaj enega WNV-pozitivnega krvodajalca v tekočem letu (19).

Kot smo že omenili, presejalno testiranje NAT vseh odvzetih enot krvi na prisotnost WNV že izvajajo v sosednji Italiji. To je skladno s predpisom obvezno v vseh tistih provincah, kjer so dokazali primere okužb ljudi z WNV. Obvezno testirajo vso darovano kri v obdobju aktivnosti komarjev, to je med 15. junijem in 30. novembrom (19).

2 NAMEN DELA

Namen našega dela bo testirati arhivirane vzorce krvi krvodajalcev, ki so kri darovali v izbranih slovenskih regijah, v obdobju julij, avgust in september 2015, na morebitno prisotnost okužbe z virusom Zahodnega Nila (WNV). Slovenija, glede na klasifikacijo ECDC, sodi v geografsko območje, ki je ogroženo, in sicer zaradi ekoloških pogojev, ki omogočajo kroženje WNV, poleg tega pa je bil pri nas leta 2013 dokazan prvi primer okužbe človeka s tem virusom, in sicer v Spodnjeposavski regiji. V Sloveniji zaenkrat še nimamo uvedenega obveznega presejalnega testiranja NAT za WNV. V sosednjih državah pa je že prisotno širjenje okužb s tem virusom. Glede na te spremenjene epidemiološke razmere lahko pričakujemo, da bomo morali tudi pri nas uvesti presejalno testiranje NAT na WNV, in sicer v tistem obdobju tekočega leta, ko so komarji, ki prenašajo virus, najbolj aktivni. V okviru magistrske naloge bomo s presejalnim testiranjem NAT arhivskih vzorcev enot krvi, darovanih na opredeljenih geografskih področjih naše države v poletnem obdobju leta 2015, ugotavljali obseg okuženosti slovenskih krvodajalcev z WNV.

Glavni cilji naše raziskave bodo:

- zbrati zadostno število reprezentativnih vzorcev krvi iz arhiva Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, s pomočjo katerih bi lahko s kar največjo verjetnostjo dobili podatke o možnih okužbah prejemnikov transfuzij krvnih pripravkov z WNV;
- izbrane vzorce testirati z metodo NAT na morebitno prisotnost WNV;
- na osnovi dobljenih rezultatov oceniti tveganje za prenos okužbe z WNV s transfuzijo krvnih pripravkov v Sloveniji;
- pripraviti izhodišča za nadaljnje ukrepanje v smislu kontinuiranega zagotavljanja preskrbe z varno in kakovostno krvjo v naši državi.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 VZORCI KRVODAJALCEV

Izbrali in uporabili smo plazemske vzorce krvodajalcev, ki so kri darovali v obdobju od konca julija do sredine septembra leta 2015. Posebej so nas zanimali vzorci krvodajalcev iz obmejnih krajev, saj so v preteklih letih zaznali povečan obseg okužbe z WNV pri prebivalcih obmejnih področij naših sosed, Italije in Hrvaške. Vzorce krvodajalcev smo zbrali tako, da smo zajeli pet slovenskih regij, Primorsko, Dolenjsko, Štajersko, Gorenjsko in Osrednjo Slovenijo. Vzeli smo jih iz arhiva Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino v Ljubljani (ZTM), kjer se centralno izvaja presejalno testiranje vseh darovanih enot krvi v Sloveniji z metodami NAT. Vsi arhivski vzorci so na ZTM shranjeni v hladni sobi pri -30 °C, in sicer v mikrotitrskih ploščicah (Micronic) s po 96 tubicami, od katerih vsaka vsebuje 1,1 mL plazme.

3.2 KONTROLNI VZORCI

Za pozitivno kontrolo pri določanju RNA WNV v vzorcih krvodajalcev z metodo NAT smo uporabili QConnect WNVRNA Control, proizvajalca Thermo Scientific, ZDA. Gre za vzorce defibrinizirane človeške plazme, ki vsebujejo izoliran in inaktiviran WNV, gojen v kulturi *in vitro*. Plazmo, ki jo uporabljajo za pripravo kontrole QConnect WNVRNA, predhodno testirajo na odsotnost RNA WNV, DNA HBV, RNA HCV in RNA HIV-1.

3.3 PRISTOP K ISKANJU IN IZBIRI VZORCEV

Ker nas je najbolj zanimalo območje blizu italijanske in hrvaške meje, smo v raziskavo vključili vse tiste, ki so kri darovali med 29. julijem in 11. septembrom 2015 v Centrih za transfuzijsko dejavnost Nova Gorica, Izola in Novo mesto. Poleg teh pa smo testirali tudi vzorce krvodajalcev, ki so jim v omenjenem obdobju kri odvzeli na terenskih krvodajalskih akcijah po Sloveniji, med drugim tudi na tistih, ki so jih izvedli v krajih blizu italijanske in hrvaške meje. Ker smo želeli testirati tudi krvodajalce, ki živijo blizu Avstrije in Madžarske, smo izbrali določeno število vzorcev krvi, odvzete v Centrih za transfuzijsko dejavnost Jesenice, Slovenj Gradec in Celje ter na terenskih akcijah UKC Maribor. Vsem omenjenim pa

smo dodali še nekaj vzorcev krvodajalcev, ki bivajo v osrednji Sloveniji in so kri darovali na ZTM.

Vse vzorce smo poiskali v podatkovni bazi s pomočjo laboratorijskega informacijskega sistema Info-PCR, razvitega na ZTM . Z njim smo določili točne položaje iskanih vzorcev v arhivu in pripravili njihove sezname. Iz arhiva smo nato vzeli 60 mikrotitrskih ploščic z zelenimi plazemskimi vzorci.

3.4 PRIPRAVA VZORCEV

Zbrane plazemske vzorce krvodajalcev smo odmrznili na sobni temperaturi. Za vsakega od njih smo na nalepko natisnili črtno kodo, nato pa jih nalepili na ustrezno število praznih 5 mL epruvet. Vanje smo iz mikrotitrskih plošč prenesli celotno količino vsakega posameznega vzorca plazme (1 mL). Tiste vzorce, ki so vsebovali fibrinogen, smo centrifugirali 10 minut pri 3000 obratih na minuto (ang. rounds per minute – rpm) in tako smo preprečili težave pri pipetiranju v analizatorju. Vse epruvete z vzorci smo pokrili s parafilmom in jih do testiranja shranili v hladilniku na 4 °C (največ 5 dni). Največkrat smo vzorce, ki smo jih pripravili za analizo, testirali že naslednji dan. Ostale vzorce v mikrotitrski ploščici, ki jih nismo vključili v raziskavo, pa smo vrnili v arhiv na -30 °C.



Slika 6: Vzorci, pripravljeni za testiranje.

3.4.1 LABORATORIJSKI MATERIAL IN OPREMA

Za pripravo vzorcev smo uporabili naslednji material in opremo:

- plastične epruvete, 5 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija),
- pipete Biohit 20 – 200 µL (Biohit, Helsinki, Finska),
- pipete Biohit 100 – 1000 µL (Biohit, Helsinki, Finska),
- nastavke za pipete s filtrom Biohit SafetySpace Filter Tip: 2 – 120 µL (Biohit, Helsinki, Finska),
- aluminijasto folijo (Ratiolab GmbH, Dreieich, Nemčija),
- tiskalnik črtnih kod Eltron TLR 2742 (Zebra Technologies, ZDA),
- centrifugo Heraeus Multifuge 3S (Kendo, Nemčija),
- hladilnik Liebherr Medline (Liebherr, Avstrija).

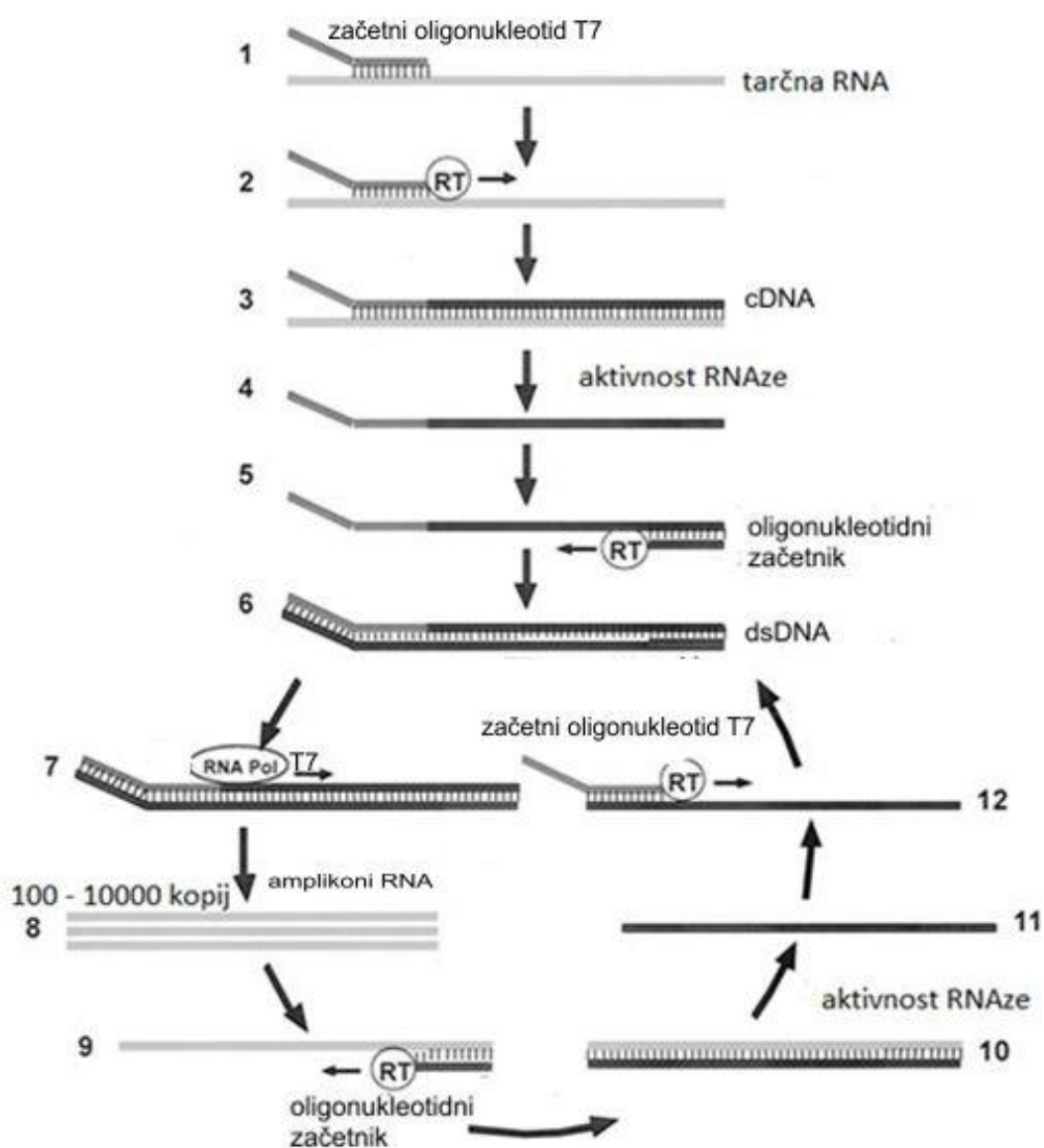
3.5 TESTIRANJE VZORCEV Z AVTOMATIZIRANIM ANALIZATORJEM PROCLEIX® PANTHER

Testiranje plazemskih vzorcev smo izvedli na popolnoma avtomatiziranem analizatorju Procleix® Panther, s kompletom reagentov Procleix WNV. Avtomatizirani sistem deluje na principu pomnoževanja in dokazovanja virusne nukleinske kisline (NAT). Analizator izvaja zaznavanje virusa z metodo TMA (ang. Transcription Mediated Amplification).

3.5.1 PRINCIP TESTA

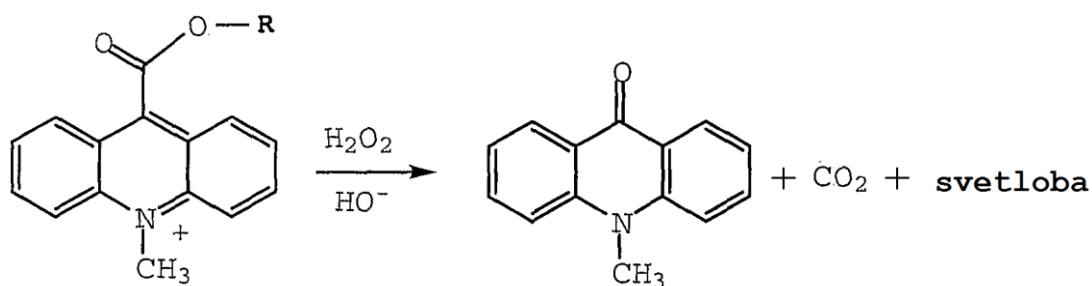
TMA (Slika 7) je metoda pomnoževanja RNA, posredovana z njenim prepisovanjem *in vitro*. Gre za izotermno pomnoževanje, saj reakcijo izvajamo pri konstantni temperaturi, zato ne potrebujemo temperaturnih ciklov. Z njo lahko v razmeroma kratkem času zaznamo in pomnožimo majhne količine genskega materiala. Produkt pomnožitvene reakcije so kopije RNA. Tarčno RNA, ki jo želimo pomnožiti, s posebnimi lovilnimi sondami pripnemo na magnetne kroglice, nevezan material pa odstranimo s spiranjem. Lovilne sonde predstavljajo specifični oligonukleotidni začetniki, ki se na enem koncu specifično vežejo na nukleotidno zaporedje tarčne RNA v vzorcu, na drugem koncu pa na zajemne magnetne kroglice. Sledi pomnožitev molekul virusnih RNA z metodo TMA. Za izvedbo tega koraka potrebujemo dva

encima, in sicer reverzno transkriptazo in RNA-polimerazo T7. Z reverzno transkriptazo ustvarimo kopije tarčne nukleinske kisline v obliki cDNA, nato pa začne RNA-polimeraza T7 prepisovati novonastale molekule cDNA v amplikone RNA. Tako dobimo veliko število pomnoženih tarčnih zaporedij RNA. Novonastali amplikoni RNA lahko ponovno vstopajo v reakcijo in služijo kot matrice za nove pomnoževalne cikle (25).



Slika 7: Pomnoževanje, posredovano s prepisovanjem RNA - TMA. Pomnožitev virusnih molekul RNA z metodo TMA poteka tako, da najprej z reverzno transkriptazo (RT) ustvarimo molekule komplementarne tarčne nukleinske kisline cDNA. Nato z RNAzo odstranimo RNA in se znebimo ostalih kontaminantov (RNA začetni nukleotidi). Encim RNA-polimeraza T7 prepíše komplementarno cDNA v ustrezno število amplikonov RNA, ti pa lahko ponovno vstopajo v reakcijo (26).

Posebne lovilne sonde vežemo tako na pomnožene molekule virusne RNA kot na notranje kontrole (Slika 5). Notranjo kontrolo obvezno uporabljamo tekom celotnega postopka NAT. Služi nam za kontrolo funkcionalnosti vsakega posameznega testiranega vzorca, kar pomeni, da spremljamo učinkovitost posameznega testa. Pomnožene produkte tarčne nukleinske kisline analizator zazna v obliki kemiluminiscence. Pomnoženemu vzorcu namreč dodamo z akridinijevim estrom označene sonde, ki se specifično komplementarno vežejo z nukleotidnim zaporedjem na amplikonih RNA in oddajajo svetlobo.



Slika 8: Reakcija kemiluminiscence z akridinijevim estrom. Ob prisotnosti peroksidaze, aromatski akridinijev ester oksidira v nestabilen peroksidni intermediat, ki ob prehodu iz vzbujenega stanja v energijsko stabilnejši akridon oddaja svetlobo, ki jo izmeri analizator (27).

Pomnožene produkte RNA ločimo od interne kontrole z uporabo različnih oblik z akridinijevim estrom označenih komplementarnih sond. Tiste, ki se specifično vežejo na pomnožene amplikone RNA notranje kontrole, po vezavi izkazujejo hitrejšo kinetiko emisije svetlobe, zato njihovi signali pobliskujejo, medtem, ko tiste, ki so specifične za pomnožene tarčne amplikone v vzorcu oddajajo konstantno svetlobo, kar pomeni, da sijajo oz. svetijo (28). Signale ozadja zmanjšamo s selektivno inaktivacijo akridinijevega estra na nevezanih sondah.

3.5.2 REAGENTI

Za izvedbo specifičnega zaznavanja in pomnoževanja RNA WNV v vzorcih smo uporabljali testni komplet reagentov za testiranje 5.000 vzorcev, proizvajalca Grifols, ZDA, ki je vseboval:

- reagent z notranjo kontrolo (Internal Control Reagent) , ki vsebuje tudi detergent in kopijo RNA WNV, v 5 mL raztopine s pufrom Hepes (N-(2-hidroksietil) piperazin-N'-2-etansulfonska kislina);
- reagent s specifičnimi lovilnimi sondami in magnetnimi mikrokroglicami (Target Capture Reagent) v 280 mL raztopine s pufrom Hepes;
- reagent za pomnoževanje z oligonukleotidnimi začetniki, dNTP, NTP in kofaktorji (Amplification reagent), v 50 mL raztopine s pufrom Hepes;
- reagent z encimi, ki vsebuje reverzno transkriptazo in RNA-polimerazo T7 (Enzyme reagent) v 18 mL raztopine s pufroma Hepes in Tris;
- reagent s sondo, ki vsebuje specifične kemiluminiscentne oligonukleotide (Probe reagent), v 75 mL raztopini pufru;
- selekcijski reagent z dodanimi površinsko aktivnimi snovmi (Selection reagent) v 180 mL raztopine boratnega pufru;
- tekočino za spiranje.

3.5.3 KALIBRACIJA

Za lastno kalibracijo analizator uporabi naslednje kalibratorje, ki so sestavni del kompleta reagentov Procleix[®] WNV:

- Procleix WNV ASSAY Negative Calibrator z 2 mL Hepes puferske raztopine z detergentom, ki preprečuje nespecifične vezave,
- Procleix WNV Assay Positive Calibrator z 2 mL Hepes puferske raztopine, ki vsebuje detergent in WNV RNA kopijo.

Po samodejnih nastavitvah analizatorja smo kalibratorje vedno analizirali v trojnih ponovitvah. Če sta bili vsaj dve od treh ponovitev meritev negativnega in pozitivnega kalibratorja veljavni, je računalniški program analizatorja potrdil veljavnost serije testiranih vzorcev.

3.5.4 LABORATORIJSKA OPREMA

Za potrebe testiranja vzorcev smo uporabili:

- stresalnik POLYMAX 2040 (Heidolph, Nemčija),
- inkubator Procleix[®] za pripravo reagentov (Hologic, San Diego, ZDA),
- nastavki za pipetiranje s filtri, LiHa Disposable Tips 1.000 µL (Tecan, Švica),

- epruvete s pokrovčki, Multi – Tube Unit (Gen-Probe , San Diego, ZDA),
- analizator Procleix® Panther (Grifols, ZDA).

3.5.5 POTEK DELA

Reagente smo pripravili skladno z navodili proizvajalca. Raztopili smo jih v inkubatorju Procleix® za pripravo reagentov (RPI), ki omogoča hkratno mešanje reagentov in njihovo ogrevanje na sobno temperaturo. Notranjo kontrolo smo raztopili na stresalniku izven inkubatorja tako, kot to priporoča proizvajalec.

Preglednica V: Priprava reagentov (29).

Reagent	Shranjevanje pred odprtjem	Uporaba inkubatorja RPI	Temperatura testiranja
Internal Control Reagent	-15 °C do -35 °C	NE	sobna temperatura 15°C do 30 °C
Target Capture Reagent	2 °C do 8 °C	DA	
Amplification reagent	-15 °C do -35 °C	DA	
Enzyme reagent	-15 °C do -35 °C	DA	
Probe reagent	-15 °C do -35 °C	DA	
Selection reagent	sobna temperatura	DA	
Tekočina za spiranje	sobna temperatura	NE	
Kalibratorji	-15°C do -35 °C-	NE	

Vsebinsko notranje kontrole smo združili z reagentom Target Capture Reagent (TCR), da smo dobili delovni reagent, pripravljen za analizo. Notranje kontrole nam, kot smo že omenili, služijo za spremljanje učinkovitosti poteka analize v vsakem posameznem vzorcu. Pripravljene reagente smo vstavili v analizator in najprej izvedli meritve kalibratorjev, nato pa smo kontinuirano vstavljali pripravljene vzorce krvodajalcev, ki so vsebovali po 1 mL plazme. Komplet reagentov je zadostoval za 500 testov, vključno s kalibracijo in merjenjem kontrolnih vzorcev. Po vsakokratni vstavitvi nove serije reagentov smo izvedli novo kalibracijo. Celotna analiza posameznega vzorca se izvede v eni sami epruveti Multi – Tube Unit. Za vsak test je analizator avtomatsko odpipetiral po 500 µL plazme.



Slika 9: Avtomatizirani analizator Procleix® Panther (30).

3.5.6 INTERPRETACIJA REZULTATOV

Integrirani sistemski računalnik analizatorja Procleix® Panther je samodejno opredelil rezultate testov kot reaktivne ali nereaktivne. Izračunal jih je na podlagi izmerjenih in izračunanih mejnih vrednosti signala notranje kontrole in vsakokratnega analita, torej tarčne virusne RNA. Aparat izmeri emisijo svetlobe in jo poda v obliki vrednosti RLU (ang. Relative Light Units). Na podlagi meritev nato izračuna mejne vrednosti ter razmerja med izmerjeno vrednostjo signala analita in mejno vrednostjo analita (S/CO).

Mejne vrednosti aparat izračuna po naslednjih enačbah:

Mejna vrednost notranje kontrole v RLU = $0,5 \times$ srednja vrednost negativnega kalibratorja (RLU notranje kontrole)

Mejna vrednost analita RNA WNV v RLU = srednja vrednost negativnega kalibratorja (RLU analita) + $0,3 \times$ srednja vrednost pozitivnega kalibratorja (RLU analita)

Rezultat je nereaktiven, če je razmerje $S/CO < 1$, signal notranje kontrole pa večji od mejne vrednosti notranje kontrole in manjši od 750.000 RLU.

Rezultat je reaktiven, če je razmerje $S/CO \geq 1$, signal notranje kontrole pa manjši od 750.000 RLU.

RESULTS BY WORKLIST REPORT

Serial Number:	00653	System SW Version:	5.3.2.9	Date Range:	6/7/2016 14:52:08 to 6/7/2016 23:27:09
Assay:	WNV				
Worklist IDs:	00653-20160607-02	Version:	2.6.5 (For In Vitro Diagnostic Use)	ML:	113932 Exp: 6/15/2016 TCR: 02718 ICCutoff: 97008
	AnalyteCutoff: 62407				

WNV

Version: 2.6.5 (For In Vitro Diagnostic Use)

Worklist ID: 00653-20160607-02

Time	Rack-Tube #	Sample ID	IC RLU	IC Result	RLU	S/CO	Result
6/7/2016 14:52:08	589-01	Negative Calibrator - Lot 114094	193161	Valid	874	0.01	Valid
6/7/2016 14:52:08	589-01	Negative Calibrator - Lot 114094	198156	Valid	0	0.00	Valid
6/7/2016 14:52:08	589-01	Negative Calibrator - Lot 114094	190733	Valid	0	0.00	Valid
6/7/2016 14:52:09	589-02	WNV Calibrator - Lot 114095	119816	Valid	2181688	34.95	Valid
6/7/2016 14:52:09	589-02	WNV Calibrator - Lot 114095	197839	Valid	2078730	33.30	Valid
6/7/2016 14:57:10	589-02	WNV Calibrator - Lot 114095	264434	Valid	1951170	31.26	Valid
6/7/2016 14:57:10	589-03	EQC WNV	223559	Valid	1890916	30.29	Reactive
6/7/2016 14:57:10	589-04	P00187558P	194532	Valid	0	0.00	Nonreactive
6/7/2016 14:57:10	480-01	P00187810P	181898	Valid	0	0.00	Nonreactive
6/7/2016 14:57:10	480-02	P00187811P	180680	Valid	0	0.00	Nonreactive

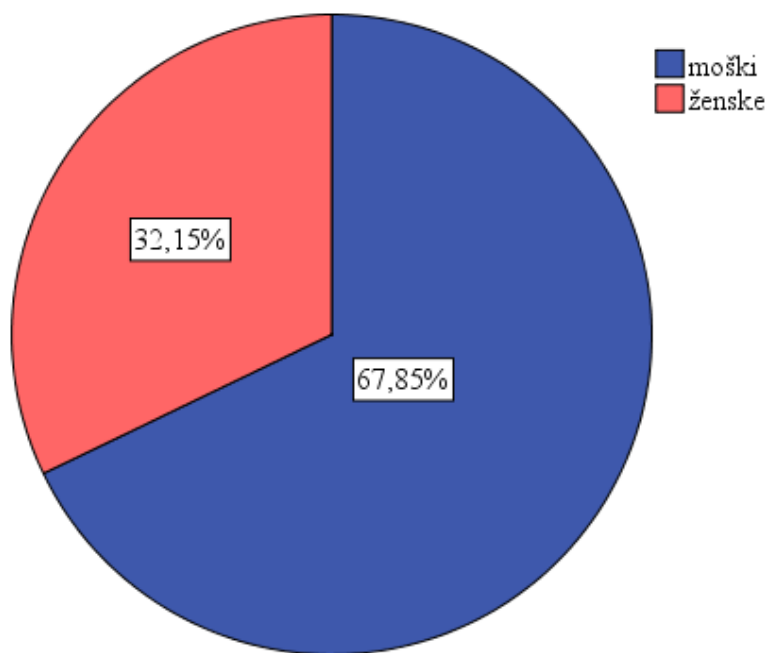
Slika 10: Primer interpretacije rezultatov. Aparat na delovnem listu poda naslednje vrednost: ICCutoff – izračunano mejno vrednost notranje kontrole; AnalyteCutoff – izračunano mejno vrednost analita RNA WNV; IC RLU – vrednost RLU notranje kontrole; vrednost RLU analita; vrednost S/CO - razmerje med signalom in mejno vrednostjo analita. Rezultat je reaktiven, če je vrednost razmerja S/CO < 1 in nereaktiven, kadar je vrednost S/CO ≥ 1.

4 REZULTATI

V študiji smo s testom NAT Procleix[®] WNV iskali morebitno prisotnost virusa Zahodnega Nila v individualnih plazemskih vzorcih krvodajalcev. Skupno smo analizirali 3.888 vzorcev. Opravili smo 4.400 testov, od tega 60 s kalibratorji (30 pozitivnih in 30 negativnih kalibratorjev), 54 s kontrolo QConnect in 4.286 z vzorci krvodajalcev. Neveljavnih testov je bilo 386, od tega 2 z negativnim kalibratorjem in 384 z vzorci krvodajalcev. Testiranje vseh neveljavnih vzorcev, z izjemo dveh, pri katerih volumen preostale plazme ni zadostoval za ponovno izolacijo RNA WNV, smo ponovili. Ker vzorcev krvodajalcev nismo primerjalno testirali še s kakšno drugo molekularno-biološko metodo, naših rezultatov ne moremo primerjalno vrednotiti.

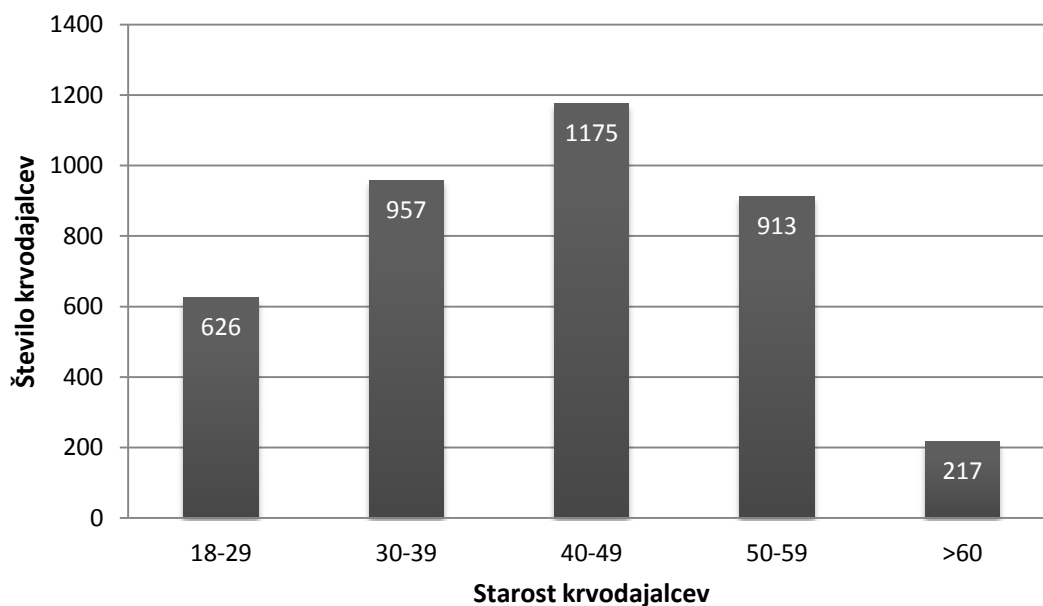
Spol in starost

Med krvodajalci, ki smo jih testirali na prisotnost WNV, je bilo 2.638 (67,8%) moških in 1.250 (32,1%) žensk (Slika 10).



Slika 11: Grafični prikaz krvodajalcev glede na spol.

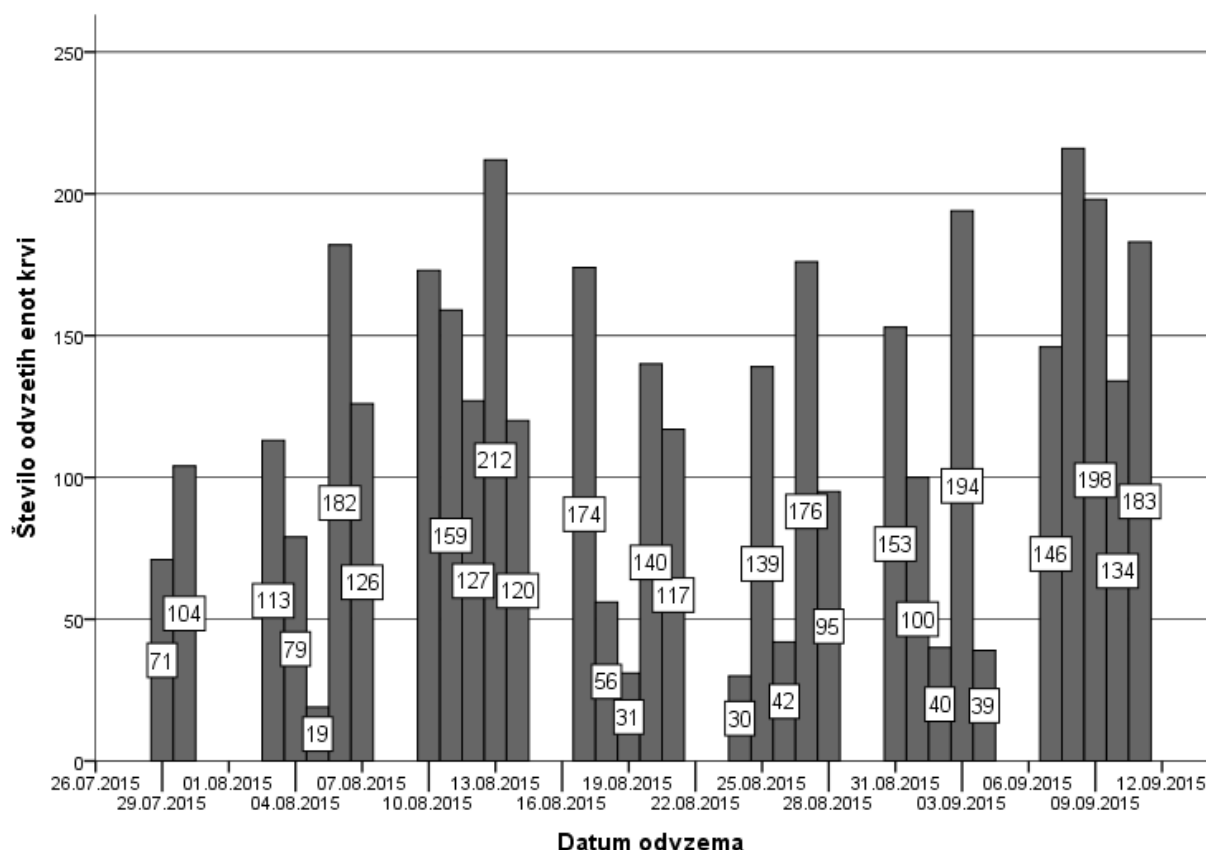
Povprečna starost preiskovancev je bila 42 let. Najmlajši je bil star 18, najstarejši pa 66 let. Največ oseb, vključenih v raziskavo, je bilo starih med 40 in 49 let (Slika 11), najmanj zastopana skupina pa so bili starostniki (>59 let). Porazdelitveni vzorec starosti preiskovancev je primerljiv z deleži starostnih skupin v celotni populaciji slovenskih krvodajalcev.



Slika 12: Frekvenčni prikaz starosti testiranih krvodajalcev (N = 3.888).

Časovni okvir odvzema preiskovanih vzorcev

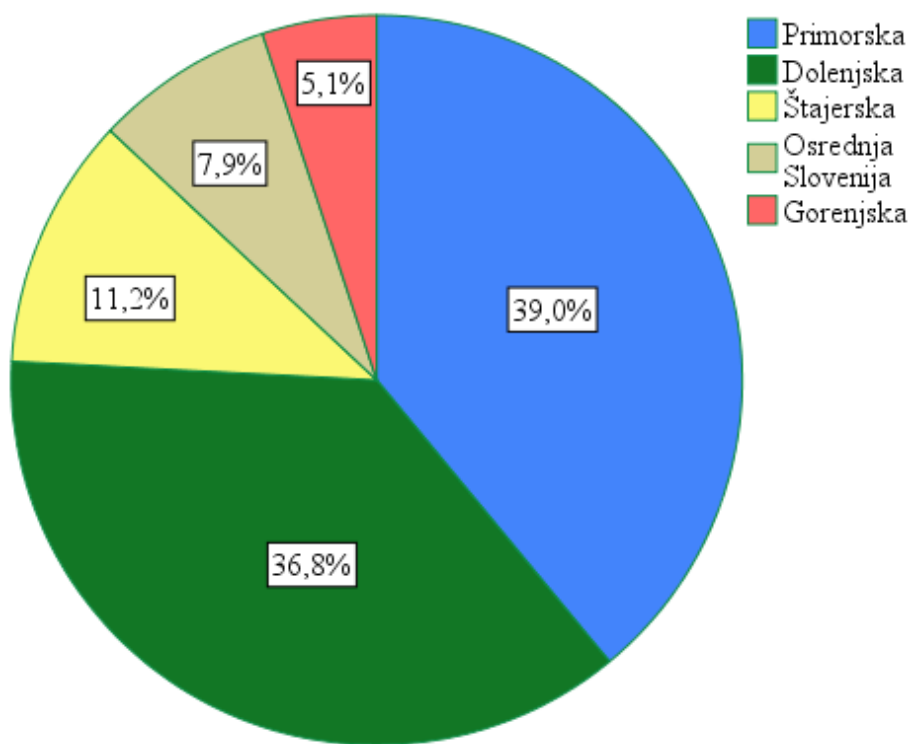
Vzorci smo izbirali med odvzemi, ki so bili opravljeni med 29. julijem in 11. septembrom 2015 (Slika 12). Na morebitno prisotnost WNV smo testirali 175 vzorcev krvodajalcev, ki so kri darovali v juliju, 2.463 vzorcev tistih, ki so jim jo odvzeli v avgustu in 1.250 tistih, ki so bili na odvzemu v septembru. Največji delež testiranih krvodajalcev je bil torej iz avgustovskega obdobja.



Slika 13: Frekvenčni grafični prikaz števila enot krvi, ki smo jih testirali na prisotnost WNV, glede na datum njihovega odvzema (N = 3.888).

Rezultati testiranja krvodajalcev po regijah

Želeli smo testirati predvsem krvodajalce iz potencialno ogroženih geografskih območij, ki so blizu meja s sosednjimi državami, v katerih se pojavljajo izbruhi okužb z WNV. Največ krvodajalcev, ki smo jih vključili v raziskavo je bilo s Primorske (1.517 ali 39% vseh testiranih) (Slika 13). Skoraj toliko je bilo vzorcev z Dolenjske, in sicer 1.431 (36,8% vseh testiranih). Deleži ostalih regionalno opredeljenih vzorcev krvodajalcev so bili manjši: 434 s Štajerske, 309 iz Osrednje Slovenije in 197 z Gorenjske. Za testiranje NAT smo sicer izbrali več vzorcev krvodajalcev iz omenjenih, manj zastopanih regij, vendar pa smo jih nato zaradi premajhne količine razpoložljivih reagentov selektivno izločili iz raziskave. V posameznem geografskem območju so krvodajalci kri darovali tako v regionalnih Centrih za transfuzijsko dejavnost (CTD) kot na terenskih krvodajalskih akcijah.



Slika 14: Grafični prikaz deležev testiranih vzorcev darovanih enot krvi, glede na regije, kjer so bile odvzete.

Primorska

Kraji odvzemov, ki smo jih uvrstili v območje Primorske so bili: CTD Izola in Nova Gorica ter terenske akcije, izvedene v Postojni, Sežani, Cerknem, Ilirski Bistrici in Škocjanu (Preglednica VI). Največje število vzorcev je bilo odvzetih v CTD Izola, najmanj pa v Škocjanu. Za vse v raziskavo vključene krvodajalce smo preverili lokacije njihovih prebivališč in ugotovili, da so vsi živeli v bližini krajev, kjer so potekali odvzemi krvi. V nobenem od testiranih vzorcev preiskovancev iz krajev v bližini italijanske meje nismo potrdili prisotnosti WNV ($S/CO < 1$) (Preglednica VI).

Dolenjska

V Dolenjsko regijo smo zajeli odvzeme, izvršene na terenskih krvodajalskih akcijah v Brežicah, Sevnici, Kočevju, Krškem, Ribnici, Mokronogu, Trebnjem in Šentrupertu ter tiste, ki so jih opravili v CTD Novo Mesto (Preglednica VII). Tudi med temi preiskovanci nismo odkrili nobenega vzorca, ki bi bil pozitiven na WNV (Preglednica VII). Najmanj vzorcev je bilo odvzetih v Mokronogu, največ, skoraj polovica vseh, pa v CTD Novo Mesto.

Štajerska

Vseh 434 preiskovancev s Štajerske je bilo nereaktivnih na WNV ($S/CO < 1$). Kri so darovali v CTD Slovenj Gradec, Centru za transfuzijsko medicino (CTM) na UKC Maribor, Transfuzijskem centru (TC) Splošne bolnišnice Celje in na terenskih krvodajalskih akcijah v Ločah, Hudi Jami, Makolah, Selnici ob Dravi, Podčetrtku in Rušah. Največ enot krvi, ki smo jih testirali v raziskavi, je bilo odvzetih v CTD Slovenj Gradec, najmanj pa v CTM UKC Maribor (Preglednica VIII).

Osrednja Slovenija

Vsa darovana kri krvodajalcev z območja Osrednje Slovenije je bila odvzeta na ZTM. Na odvzem krvi na ZTM Ljubljana vsakodnevno prihajajo krvodajalci iz različnih krajev Slovenije. Zato smo v namen reprezentativnosti osrednjega dela države izbirali le tiste, ki bivajo v Ljubljani in v njeni okolici. Vseh analiziranih enot krvi je bilo 197 in v nobeni nismo dokazali WNV (Preglednica IX).

Gorenjska

Zadnja skupina testiranih krvodajalcev je bila z Gorenjske. Vanjo smo vključili vzorce enot krvi, ki so bile odvzete v CTD Jesenice, poleg tega pa tudi nekaj tistih iz te regije (glede na preverjene naslove stalnih prebivališč), ki so kri darovali na ZTM in na krvodajalski akciji v Sežani. Prav tako so bili tudi v tem primeru vsi testirani vzorci nereaktivni na WNV (Preglednica X).

Preglednica VI: Rezultati testiranja NAT krvodajalcev s Primorske.

Test Procleix® Panther WNV			
Geografsko območje	Kraj odvzema krvi	Nereaktivni vzorci	Reaktivni vzorci
		$S/CO < 1$	$S/CO \geq 1$
Primorska	CTD Izola	504	0
	Teren – Postojna	380	0
	CTD Nova Gorica	308	0
	Teren – Sežana	167	0
	Teren – Ilirska Bistrica	83	0
	Teren – Cerklje	40	0
	Teren – Škocjan	35	0

Skupaj	1.517	0
---------------	--------------	----------

Preglednica VII: Rezultati testiranja NAT krvodajalcev z Dolenjske.

Test Procleix® Panther WNV			
Geografsko območje	Kraj odvzema krvi	Nereaktivni vzorci S/CO < 1	Reaktivni vzorci S/CO ≥ 1
Dolenjska	CTD Novo mesto	614	0
	Teren - Sevnica	199	0
	Teren - Brežice	177	0
	Teren - Kočevje	134	0
	Teren - Ribnica	112	0
	Teren - Krško	92	0
	Teren - Trebnje	76	0
	Teren - Šentrupert	15	0
	Teren - Mokronog	9	0
Skupaj		1.428	0

Preglednica VIII: Rezultati testiranja NAT krvodajalcev s Štajerske.

Test Procleix® Panther WNV			
Geografsko območje	Kraj odvzema krvi	Nereaktivni vzorci S/CO < 1	Reaktivni vzorci S/CO ≥ 1
Štajerska	CTD Slovenj Gradec	113	0
	Teren – Loče	71	0
	Teren – Huda jama	57	0
	Teren – Makole	47	0
	Teren – Ruše	45	0
	Teren – Sladki vrh	34	0
	TC Celje	30	0
	Teren – Selnica ob Dravi	18	0
	Teren- Podčetrtek	11	0
	CTM Maribor	8	0
Skupaj		434	0

Preglednica IX: Rezultati testiranja NAT krvodajalcev iz Osrednje Slovenije.

Test Procleix® Panther WNV			
Geografsko območje	Kraj odvzema krvi	Nereaktivni vzorci	Reaktivni vzorci
		S/CO < 1	S/CO ≥ 1
Osrednja Slovenija	ZTM Ljubljana	309	0
Skupaj		309	0

Preglednica X: Rezultati testiranja NAT krvodajalcev z Gorenjske.

Test Procleix® Panther WNV			
Geografsko območje	Kraj odvzema krvi	Nereaktivni vzorci	Reaktivni vzorci
		S/CO < 1	S/CO ≥ 1
Gorenjska	ZTM Ljubljana	127	0
	CTD Jesenice	69	0
	Teren – Sežana	1	0
Skupaj		197	0

Analitska občutljivost testa Procleix® WNV

Analitska občutljivost testa je najmanjša količina ciljnega označevalca, ki jo še lahko natančno zaznamo. Skladno z Odločbo Komisije Evropskih skupnosti, z dne 7. maja 2002, o skupnih tehničnih specifikacijah za diagnostične medicinske pripomočke *in vitro*, moramo analitsko občutljivost testov NAT podati v obliki 95% pozitivne mejne vrednosti. To pomeni, da predstavlja analitsko občutljivost pri zaznavanju RNA WNV tista koncentracija virusne RNA, pri kateri s 95% testnih serij dobimo pozitivne rezultate meritev zaporednih razredčitev referenčnega materiala (31).

Za izračun analitske občutljivosti našega testa NAT smo uporabili redčine kontrolnega vzorca QConnect z začetno koncentracijo 420 kopij RNA WNV/mL. Pripravili smo 5 razredčitev v šestih paralelnih ponovitvah. Poleg tega smo v dvojniku izmerili še število reaktivnih vzorcev v kontrolnem vzorcu. Dobljene rezultate (Preglednica XI) smo statistično obdelali z analizo Probit, s katero določamo ponovljivost rezultatov meritev različnih koncentracij analita. Tako smo določili analitsko občutljivost našega testa, ki je bila 44,8 kopij RNA WNV/mL. To pomeni, da lahko pri 44,8 kopijah RNA WNV, prisotnih v 1 ml vzorca, pričakujemo 95% pozitivnih rezultatov testov v posamezni seriji ponovitev.

Preglednica XI: Zaznavanje RNA WNV s testom Procleix® Panther WNV v različnih razredčinah kontrolnega vzorca.

Štev. kopij RNA WNV/mL	Pozitivni rezultati	Štev. ponovitev meritev	% pozitivnih rezultatov
420	2	2	100
70	6	6	100
26	5	6	83
18	1	6	17
9	0	6	0
4	2	6	33

5 RAZPRAVA

V okviru magistrske naloge smo z metodo NAT testirali individualne plazemske vzorce krvodajalcev na morebitno prisotnost WNV. Ugotavljali smo morebitno prisotnost RNA WNV v enotah krvi krvodajalcev, odvzetih v obdobju med koncem julija in sredino septembra leta 2015, in sicer v petih geografskih področjih. Med 3.888 testiranimi krvodajalci nismo našli nobenega, ki bi bil reaktiven na WNV RNA.

V Sloveniji smo do sedaj potrdili en sam primer okužbe z WNV, in sicer leta 2013 (14). Na našem ozemlju pa so dokazali tudi protitelesa proti WNV v pticah selivkah, domačih fazanih in mestnih golobih. Na prisotnost virusa so leta 2012 testirali komarje, ujete v Kopru in Novi Gorici, vendar v nobenem niso našli WNV (6). V Sloveniji še nismo uradno ugotavljali oz. nadzirali prisotnosti virusa v komarjih in pticah. Vsi navedeni podatki so bili namreč pridobljeni v okviru posameznih raziskovalnih projektov (6). V letih 2014 in 2015 v Sloveniji ni bilo zabeleženih nobenih primerov okužbe z WNV, zato nismo pričakovali, da bi v testiranih vzorcih odkrili kakšnega, ki bi vseboval virus in s tem povezano možnost prenosa virusa s transfuzijo. Dodatna varovalka je seveda dejstvo, da pri nas vse krvodajalce, ki bi se lahko okužili med potovanjem v države z dokazanimi okužbami ljudi z WNV, odklonimo za obdobje 28 dni po vrnitvi s teh območij. Po izteku tega varnostnega obdobja namreč lahko izključimo možnost prisotnosti WNV v krvi. Zaradi pogostejšega pojavljanja okužb na Hrvaškem in v Italiji bi lahko pričakovali, da bi lahko virus krožil tudi v naši državi, še posebej v obmejnih področjih. Zato smo v našo raziskavo vključili vzorce vseh odvzetih enot krvi iz izpostavljenih območij, vendar pri nobenem nismo potrdili prisotnosti WNV.

Pri vzorčenju smo upoštevali dejstvo, da so okužbe z WNV najpogostejše v poletnih mesecih in na območjih, kjer so komarji najaktivnejši. Glede okužbe so ogrožene vse starostne skupine ljudi, vendar pa je potek bolezni pri starejših in imunsko oslabljenih osebah veliko bolj neugoden in nevaren. Z zbranimi vzorci smo pokrili zastopanost vseh starostnih skupin, pri čemer je bilo med njimi pričakovano najmanj tistih, ki so pripadali krvodajalcem, starejšim od 60 let.

V literaturi smo zasledili, da so podobno raziskavo naredili že v Avstriji in Italiji. V Avstriji so poleti leta 2014, v regiji z že dokazanim primerom okužbe z WNV, testirali krvodajalce z metodo NAT in pri tem odkrili en reaktiven vzorec. Darovana enota krvi je pripadala krvodajalki ženskega spola, ki v času darovanja ni imela simptomov okužbe, tri dni po tem pa je opazila bolečine v mišicah in izpuščaje na koži (32). V Italiji so leto dni po prvem izbruhu okužb ljudi z WNV leta 2008, začeli s presejalnim testiranjem WNV z metodo NAT, in sicer

v provincah, v katerih so le-te dokazali. Testirali so vse enote krvi, ki so bile darovane med 15. julijem in 30. novembrom in odkrili kar 14 reaktivnih vzorcev. Nobeden od krvodajalcev s potrjeno okužbo ni kazal nikakršnih simptomov, pa tudi po odkritju, da je prenašalec WNV, ni nihče poročal o kakršnihkoli znakih bolezni. Polovico vseh enot krvi so testirali v zlivkih, polovico pa v posameznih vzorcih. Pojavnost okuženih enot krvi je tako bila 1,2 na 10.000 darovanih. V Italiji so odkrili največ z WNV okuženih enot krvi med tistimi, ki so bile odvzete v avgustu in septembru (19).

Glede na navedene podatke vidimo, kako pomembna sta epidemiološko spremljanje izbruhov okužb krvodajalcev z WNV in pripravljenost na hitro vpeljavo ustreznega presejalnega testa NAT. Zato smo v našo raziskavo prednostno vključili predvsem vzorce krvodajalcev iz potencialno ogroženih predelov Slovenije, ki so kri darovali v, za okužbo z WNV, kritičnih mesecih leta 2015. Med njimi jih je bilo največ odvzetih v avgustu (63%) in septembru (32%).

Da smo dobili zanesljive rezultate testiranja plazemskih vzorcev 3.888 krvodajalcev smo morali izvesti 4.286 testov. Pri tem smo porabili 9 testnih kompletov reagentov. Z dvema od njih smo dobili 384 neveljavnih rezultatov, zato smo morali testiranje teh vzorcev ponoviti z novim kompletom reagentov in z novo kalibracijo. Do napak pri testiranju je verjetno prišlo zaradi neustreznega rezultata meritev notranje kontrole in posledične blokade vseh dobljenih rezultatov testne serije. Analizator namreč poda veljaven rezultat le v primeru, ko je izmerjeni signal notranje kontrole enak ali večji od izračunane mejne vrednosti le-te.

V okviru raziskave smo določili tudi občutljivost uporabljenega testa Procleix[®] WNV. Njegov proizvajalec je analitsko občutljivost testa, izvedenega na sistemu Procleix[®] Panther, definiral z vrednostjo 11,9 kopij RNA WNV/mL pri 95% mejni vrednosti. Na osnovi naših meritev pa smo izračunali višjo vrednost, in sicer 44,8 kopij RNA WNV/mL. To slabšo občutljivost lahko pripišemo manjšemu številu ponovnih meritev. Razredčitve kontrolnega vzorca smo namreč testirali v šestih ponovitvah, medtem, ko je proizvajalec vsako razredčino znane koncentracije RNA WNV testiral 144-krat.

6 SKLEP

Vedno toplejše podnebje in obilnejše prehodne padavine povečujejo aktivnost komarjev, s tem pa tudi možnost izbruhov okužb z virusom Zahodnega Nila (WNV). Ta se lahko prenaša tudi s transfuzijo krvi in tako ogroža varnost preskrbe s to dragoceno tekočino. Epidemiološko stanje glede okužb z WNV v sosednjih državah, zlasti v Italiji in na Hrvaškem, nakazuje možno nevarnost epidemije tudi za Slovenijo. V okviru magistrske naloge smo prvič do sedaj načrtno pregledali vzorce darovanih enot krvi v Sloveniji na prisotnost okužbe z WNV. Ugotovili smo, da v 3.888 testiranih plazemskih vzorcih posameznih krvodajalcev, ki so kri darovali v obdobju med 29. julijem in 11. septembrom 2015 ni bilo prisotne virusne RNA. To smo dokazali s testom NAT WNV, ki smo ga izvedli na popolnoma avtomatiziranem sistemu Procleix® Panther. Ta zagotavlja dobro občutljivost in veliko razpoložljivost testiranja ter razmeroma kratek čas obdelave rezultatov.

Menimo, da je spremljanje epidemioloških razmer glede okužb z WNV v Sloveniji potrebno, saj to terja njen geografski položaj. Uvedba presejalnega testiranja NAT na prisotnost WNV v posameznih darovanih enotah krvi bi zagotovo povečala varnost zaloge krvi. Razumljivo pa je, da bi bilo testiranje smiselno le v tistem obdobju leta, ko so komarji, ki so prenašalci virusa, aktivni. Morebitna uvedba presejalnega testiranja krvodajalcev na WNV bi zahtevala spremembo Pravilnika o preskrbi s krvjo in komponentami krvi, pri čemer bi morali jasno opredeliti način in pogoje za njegovo izvajanje. Na ZTM pa že imajo ustrezne prostore, opremo in kadre, ki omogočajo takojšnjo uvedbo tovrstnega dodatnega testiranja krvodajalcev.

7 LITERATURA

1. Colpitts TM, Conway MJ, Montgomery RR, Fikrig E: West Nile Virus: Biology, Transmission, and Human Infection. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25(4): 635–648.
2. Petersen LR, Brault AC, Nasci RS: West Nile Virus. *Review of the Literature. JAMA* 2013; 310(3): 308–315.
3. Hayes EB, Sejvar JJ, Zaki SR, Lanciotti RS, Bode AV, Campbell GL: Virology, Pathology, and Clinical Manifestations of West Nile Virus Disease. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(8): 1174–1179.
4. Davis LE, DeBiasi R, Goade DE, Haaland KY, Harrington JA, Harnar JB: West Nile virus neuroinvasive disease. *Ann Neurol* 2006; 60(3): 286–300.
5. Suthar MS, Diamond MS, Gale Jr: West Nile virus infection and immunity. *Nat Rev Microbiol* 2013; 11(2): 115–128.
6. Recek M, Avsec S, Avšič Županc T, Duh D, Breznik M, Čebulc G, Faganel M, Fatur T, Hrovatin B, Kalan K, Levičnik Stezinar S, Lovrec M, Mali P, Malovrh T, Perharič L, Sočan M, Strle F, Račnik J, Ternifi V, Trilar T, Vrdelja M, Zver J: Načrt pripravljenosti na pojav virusa Zahodnega nila v Sloveniji: predlog delovne skupine za leto 2015 - el. knjiga. *Nacionalni inštitut za javno zdravje*. Ljubljana, 2015.
7. Hanžel Jurij: Virus Zahodnega Nila - stičišče ljudi in ptic. *Svet Ptice* 2013; 19(3): 7 - 9.
8. Community health services. Environmental Disease Control - West Nile Virus. <http://www.yavapaihealth.com/west-nile-virus>. Dostopno: avgust 2016.
9. Brinton MA: Replication Cycle and Molecular Biology of the West Nile Virus. *Viruses* 2013; 6(1): 13–53.
10. Pauli G, Bauerfeind U, Blümel J, Burger R, Drosten C, Gröner A: West Nile Virus. *Transfus Med Hemotherapy* 2013; 40(4): 265–284.
11. Semenza JC, Tran A, Espinosa L, Sudre B, Domanovic D, Paz S: Climate change projections of West Nile virus infections in Europe: implications for blood safety practices. *Environ Health* 2016; 15(1): 125-171.
12. EFSA: European Food Safety Authority. Zoonoses monitoring. Slovenia. <http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/assets/zoocountryreport13si.pdf>. Dostopno: avgust 2016.
13. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare: Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 18. izdaja, Francija 2015.
14. ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control. Historical data. http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/west_nile_fever/West-Nile-fever-maps/Pages/historical-data.aspx. Dostopno: avgust 2016.
15. ZTM: Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino. Krvodajalstvo. <http://www.ztm.si/krvodajalstvo/>. Dostopno: avgust 2016.
16. Zakon o preskrbi s krvjo 2006. Url RS 104/06.

17. Pravilnik o obveznem testiranju krvi in komponent krvi 2007. Url RS 9/932-933.
18. Pisani G, Cristiano K, Pupella S, Liumbruno GM: West Nile Virus in Europe and Safety of Blood Transfusion. *Transfus Med Hemotherapy* 2016; 43(3): 158–167.
19. Napoli C, Bella A, Declich S, Grazzini G, Lombardini L, Nanni Costa A: Integrated Human Surveillance Systems of West Nile Virus Infections in Italy: The 2012 Experience. *Int J Environ Res Public Health* 2013; 10(12): 7180–7192.
20. Levičnik Stezinar S, Rahne Potokar U: Blood donors screening for infection markers in Slovenia in the period 1991-2010. *Zdr Vestn* 2012; (81): 265–273.
21. Busch MP, Caglioti S, Robertson EF, McAuley JD, Tobler LH, Kamel H, Linnen JM, Shyamala V, Tomasulo P, Kleinman SH: Screening the Blood Supply for West Nile Virus RNA by Nucleic Acid Amplification Testing. *N Engl J Med* 2005; 353(5): 460–467.
22. Comanor L, Anderson F, Ghany M, Perrillo R, Heathcote EJ, Sherlock C, C, Zitron Ian, Hendricks D, Gordon SC: Transcription-mediated amplification is more sensitive than conventional PCR-based assays for detecting residual serum HCV RNA at end of treatment. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(10): 2968–2972.
23. Harrington T, Kuehnert MJ, Kamel H, Lanciotti RS, Hand S, Currier M, Chamberland ME, Petersen LR, Marfin AA: West Nile virus infection transmitted by blood transfusion. *Transfusion* 2003; 43(8): 1018–1022.
24. Pealer LN, Marfin AA, Petersen LR, Lanciotti RS, Page PL, Stramer SL, Stobierski MG, Signs K, Newman B, Kapoor H, Goodman JL, Chamberland ME: Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. *N Engl J Med* 2003; 349(13): 1236–1245.
25. QConnect™ WNVRNA and AcroMetrix™ BB NAT WNV Negative Control. Thermo Fischer Scientific 2015.
<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0004354-QConnect-WNV-RNA-AMX-BB-NAT-WNV-Neg-Ctrl-EN.pdf> . Dostopno: avgust 2016.
26. Giachetti C, Linnen JM, Kolk DP, Dockter J, Gillotte-Taylor K, Park M, Ho-Sing-Loy M, McCormick MK, Mimms LT, McDonough SH: Highly sensitive multiplex assay for detection of human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus RNA. *J Clin Microbiol* 2002; 40(7): 2408–2419.
27. Arnold LJ, Hammond PW, Wiese WA, Nelson NC: Assay formats involving acridinium-ester-labeled DNA probes. *Clin Chem* 1989; 35(8): 1588–1594.
28. Transcription-Mediated Amplification (TMA) technology simplifies NAT and speeds workflow I PROCLEIX [Internet]. [cited 2016 Mar 9]. Available from:
<http://www.procleix.com/en/web/procleix/tma-technology>. Dostopno: avgust 2016.
29. Procleix® WNV Assay on the Procleix® PANTHER® System
<http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/LicensedProductsBLAs/BloodDonorScreening/InfectiousDisease/UCM090247.pdf>
f. Dostopno: avgust 2016.

30. Procleix. Procleix Panther system. Smart design. Simple operation. Versatile capabilities. <http://www.procleix.com/en/web/procleix/procleix-panther-system>. Dostopno: avgust 2016.
31. Odločba Komisije Evropske skupnosti z dne 7. maja 2002 o skupnih tehničnih specifikacijah za in vitro diagnostične medicinske pripomočke 2002. Url 131, 17-30.
32. Kolodziejek J, Seidel B, Jungbauer C, Dimmel K, Kolodziejek M, Rudolf I, Hubalek Z, Allerberger F, Nowotny N: West Nile Virus Positive Blood Donation and Subsequent Entomological Investigation, Austria, 2014. *PLoS One* 2015; 10(5): 1-14.