

Ewa Brojer

BADANIA SEROLOGICZNYCH I MOLEKULARNYCH MARKERÓW HCV U DAWCÓW KRWI W POLSCE

Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa
Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej
Kierownik: Barbara Zupańska

W pracy omówiono algorytmy i przedstawiono wyniki badań przeglądowych i weryfikacyjnych HCV u polskich krwiodawców. U dawców bada się obecność przeciwciał anti-HCV, a u tych u których przeciwciał się nie wykrywa poszukuje się materiału genetycznego HCV RNA metodami biologii molekularnej.

Słowa kluczowe: dawcy krwi, anti-HCV, HCV RNA

Key words: blood donors, anti-HCV, HCV RNA

CEL I SKALA BADAŃ DAWCÓW KRWI

Celem służby krwi jest zapewnienie chorym wystarczającej ilości bezpiecznej krwi koniecznej dla ratowania ich życia. Badania przeglądowe dawców w kierunku markerów wirusowych są jednym ze sposobów zapewnienia bezpieczeństwa przetoczeń. Nie mniej ważny jest sposób kwalifikacji dawcy dokonywany przez lekarza przed każdym oddaniem krwi (1). Generalnie, dawcami nie mogą być osoby chore przewlekle, te które przebyły żółtaczkę i takie, które należą do grup ryzyka zakażeń wirusowych. Dyskwalifikacje czasowe spowodowane są chorobami ostrymi, zabiegami operacyjnymi, inwazyjną diagnostyką medyczną. Oddawanie krwi w Polsce jest dobrowolne i nieodpłatne, ponieważ wiadomo, że częstość zakażeń wirusami u dawców oddających krew w celach zarobkowych jest większa niż wśród dawców kierujących się pobudkami altruistycznymi. W Polsce tylko 0.5% krwi pobieranej jest od dawców otrzymujących rekompensaty finansowe. Rocznie w Polsce pobiera się około 1 miliona donacji. Dokonuje się badań u około 180 tysięcy dawców pierwszorazowych (w innych krajach określanych często jako kandydaci na krwiodawców) oraz u około 250 tysięcy dawców wielokrotnych, którzy regularnie oddają krew.

Badania przeglądowe w kierunku wykrycia markerów wirusowych prowadzi się testami posiadającymi międzynarodowe certyfikaty (obecnie certyfikat CE). Stosuje się testy o najwyższej czułości i swoistości. Dużą uwagę zwraca się na walidację stosowanych metod i kontrolę jakości ich przeprowadzania.

ALGORYTM BADANIA MARKERÓW ZAKAŻENIA HCV U DAWCÓW KRWI

Przed każdym oddaniem krwi u dawcy wykonuje się badanie przeciwciał anti-HCV. Każdy dawca z dodatnim wynikiem testu jest odsunięty od oddania krwi. U dawców bez przeciwciał obligatoryjnie wykonuje się badania testami biologii molekularnej (lub badanie antygenu rdzeniowego HCV), które pozwalają wykryć zakażenie HCV przed pojawieniem się przeciwciał.

U dawców wielokrotnych, u których wykryje się przeciwciała, wykonuje się dodatkowo badania weryfikacyjne: bada się RNA HCV, a u tych, u których nie wykrywa się RNA, bada się przeciwciała testem uzupełniającym opartym na technice Western Blot. Celem tych badań jest udzielenie dawcy możliwie wyczerpującej informacji co do charakteru wykrytych przeciwciał.

U dawców pierwszorazowych z dodatnimi wynikami testu przeglądowego w kierunku przeciwciał anti-HCV nie wykonuje się badań weryfikacyjnych. Kierowani są oni do lekarzy pierwszego kontaktu, którzy powinni poprowadzić ich dalszą diagnostykę.

WYNIKI BADAŃ PRZEGLĄDOWYCH ANTY-HCV I BADAŃ WERYFIKACYJNYCH U DAWCÓW Z PRZECIWCIAŁAMI

Częstość powtarzalnie dodatnich wyników testów przeglądowych anti-HCV u polskich dawców jest wyższa niż obserwowana w większości krajów Europy Zachodniej. Według danych Rady Europy w 2002 roku w Polsce wykrywalność przeciwciał anti-HCV wśród dawców pierwszorazowych wynosiła 891/100 000, a wśród dawców wielokrotnych 70/100 000. Porównanie tych wyników z wynikami w innych krajach przedstawia tabela I.

Tabela I. Częstość wykrywania przeciwciał anti HCV u dawców krwi w Polsce i w innych krajach według danych Rady Europy

Table I. The frequency of anti-HCV detection in blood donors in Poland and other European countries based on Council of Europe data

Kraj	Liczba wykrytych / 100 000 badanych	
	pierwszorazowych	wielokrotnych
Polska	891	70
Litwa	3168	720
Łotwa	4180	21
Bułgaria	1559	4
Francja	79	2
Holandia	35	1
Norwegia	70	2
Wielka Brytania	35	2

Analizy częstości wykrywania przeciwciał są w polskim krwiodawstwie prowadzone regularnie. W ciągu ostatnich 10 lat obserwuje się wyraźny (o 21% rocznie) spadek wykrywalności osób z przeciwciałami wśród dawców wielokrotnych. W grupie dawców pierwszorazowych, stanowiących do pewnego stopnia reprezentację populacji zdrowych osób żyjących w Polsce, tendencja zniżkowa jest nieznaczna i wynosi ok. 4% rocznie (2).

Jeśli przyjmie się, że rocznie pion krwiodawstwa w Polsce bada około 400 tysięcy osób, a średnio u 0,5% uzyskuje się powtarzalnie dodatnie wyniki testów przeglądowych, to ogólna liczba osób z przeciwciałami anty-HCV wynosi rocznie około 2 tysiące osób. Tyle osób kierowanych jest więc do lekarzy pierwszego kontaktu w celu dalszej diagnostyki (2). Nie ma jak dotąd opracowań oceniających, jaka część z tych osób korzysta z porad lekarzy specjalistów chorób zakaźnych.

U dawców wielokrotnych wykonuje się badania weryfikacyjne RNA HCV. Wyniki badań uzyskane w roku 2003 przedstawia tabela II. Przeanalizowano częstość wykrywania RNA HCV w próbkach osocza, w których uzyskano różne wartości ekstynkcji próbki badanej do kontroli (S/Co) w teście przeglądowym. Ogólnie RNA wykryto u 18% dawców z przeciwciałami. Częstość RNA HCV zależała od wartości S/Co testu przeglądowego. Przy wartości $>4,0$ RNA HCV wykryto u 65% osób. Podobne wyniki uzyskiwali inni autorzy (3). W badaniach tych podkreśla się, że wartość S/Co powyżej 3,8 ma dużą wartość prognostyczną dla przewidywania, że badana osoba jest zakażona HCV. Analiza wartości S/Co testu EIA u dawców wielokrotnych, których próbki były skierowane na badania w IHiT wskazuje, że jedynie u 27% stwierdzono wysokie >4 wartości S/Co, a aż u 52% osób wartości te wahały się od 1,0-1,99 (tabela II). Niskie wartości S/Co w teście EIA, szczególnie w populacji o niskim ryzyku zakażenia, jaką są dawcy krwi, z dużym prawdopodobieństwem reprezentują tzw. wyniki biologiczne fałszywie dodatnie (BFP ang. *biologically false positive*) o nieznanym podłożu (4). Wśród rozważanych przyczyn takich wyników wymienia się szczepienia przeciw grypie czy obecność autoprzeciwciał (5,6). Należy w tym miejscu przypomnieć, że w badaniach wcześniejszych, zarówno tych, przepro-

Tabela II. Zależność wykrywania RNA HCV u dawców z przeciwciałami anty-HCV od wartości S/Co testu EIA

Table II. The correlation of HCV RNA detection in anti-HCV positive blood donors and the S/Co value of EIA test

Test anty-HCV EIA		Liczba (%)	
Wynik	S/Co	Badanych	RNA HCV dodatnich
Słabo dodatni	1-1,99	202 (52%)	2 (1%)
Dodatni	2,0-3,99	85 (22%)	1 (1,2%)
Silnie dodatni	>4	105 (27%)	68 (65%)
Ogółem		392 (100%)	71 (18%)

Tabela III. Częstość wykrywania przeciwciał w teście RIBA u dawców z dodatnimi wynikami testów przeglądowych, a bez wykrywanego RNA HCV

Table III. RIBA results in EIA anti-HCV positive/HCV RNA negative blood donors

Liczba badanych	EIA anty-HCV (+) / RNA HCV (-)		
	RIBA (+)	RIBA wątpliwy	RIBA (-)
165	8	8	52
	6%	36%	59%

wadzanych w IHiT, jak i w innych krajach, częstość wykrywania RNA HCV u dawców z przeciwciałami była wyższa i wynosiła około 60-80%; nie analizowano w nich jednak wartości S/Co w teście przeglądowym (7,8).

Dodatkowe informacje o zakażeniu HCV wnoszą badania testami RIBA, LiaTek lub inne oparte na technice Western Blot, w których bada się reaktywność przeciwciał do poszczególnych białek HCV. Ich wartość do potwierdzenia swoistości przeciwciał wykrywanych w badaniach przeglądowych, jest dość ograniczona, często bowiem uzyskiwane wyniki są wątpliwe (9). U polskich dawców test ten jest stosowany tylko u dawców wielokrotnych z przeciwciałami w teście EIA bez wykrytego RNA HCV. Analiza przeprowadzona na podstawie kolejnych próbek, które wpłynęły do naszego laboratorium z Regionalnych Centrów Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa wykazała, że u 6 % takich dawców wyniki RIBA są dodatnie, 36% wątpliwe i 59% ujemne (tabela III). Wynik dodatni testu RIBA potwierdza swoistość przeciwciał, a wyniki ujemne z dużym prawdopodobieństwem wskazują, że wynik testu przeglądowego jest fałszywie dodatni i nie wynika z zakażenia HCV obecnie lub w przeszłości. Wyniki wątpliwe testu RIBA wnoszą natomiast mało informacji, co do oceny, czy dawca jest zakażony HCV. Częstość wykrywania RNA u takich osób jest niska (9). Nie można wykluczyć, że RNA HCV może zostać wykryte w kolejnym badaniu. Z naszych nieopublikowanych doświadczeń wynika też, że u części dawców, wątpliwe wyniki testu RIBA, a także wyniki RIBA ujemne, przy dodatnich wynikach testu przeglądowego utrzymują się przez wiele miesięcy – mimo, że nie wykrywa się RNA HCV. Wiadomo, że u około 15-30% osób, które wyeliminowały zakażenie HCV dochodzi do obniżenia stężenia przeciwciał, a także zaniku ich wykrywalności (10). To zjawisko tzw. serorewersji nie jest dostatecznie poznane.

BADANIA PRZEGLĄDOWE TECHNIKAMI BIOLOGII MOLEKULARNEJ W CELU WYKRYCIA RNA HCV U DAWCÓW BEZ PRZECIWCIAŁ

Od 2000 roku dawcy krwi w większości krajów rozwiniętych, w tym w Polsce badani są w kierunku markerów wirusowych nie tylko technikami serologicznymi lecz także technikami opartymi na namnażaniu kwasów nukleinowych wirusów (technika PCR – *polymerase chain reaction* lub TMA – *transcription mediated amplification*), co pozwala na identyfikację dawców z aktywnym zakażeniem HCV przed pojawieniem się przeciwciał – w okresie „okienka serologicznego” (9-14). W większości krajów bada się dawców w kierunku RNA HCV; w niektórych krajach równolegle wykonuje się badania HIV RNA,

a w nielicznych dodatkowo HBV DNA. Stosuje się dwa podstawowe algorytmy badań: wykrywanie materiału genetycznego wirusów w zlanych w pule próbek od wielu dawców lub w próbkach od pojedynczych dawców.

Najczęściej badane są tzw. „pule osocza” – zlane próbki od 8-96 dawców. W Polsce do roku 2004 badano pule po 48 donacji metodą PCR używając testu Cobas Ampliscreen HCV firmy Roche Diag. W roku 2003, w niektórych Centrach Krwiodawstwa ten system badań zastąpiono badaniami pojedynczych donacji metodą TMA, testem Procleix HCV/HIV1 firmy Chiron Corp. Od 2005 roku, ze względu na wprowadzenie badań HBV DNA wymagających większej czułości testu do wykrycia zakażenia, badana pula nie może składać z więcej niż 24 donacji. Technika TMA bada się, jak dotychczas, pojedyncze próbki.

Częstość wykrywania RNA HCV u dawców bez przeciwciał waha się w różnych krajach od 0-4,3 na 1 milion donacji (tabela IV) (11-16). Najwięcej, bo blisko 40 mln badań wykonano w USA i u 170 dawców bez przeciwciał wykryto RNA HCV (17). W Polsce przebadano dotychczas 3,6 mln i RNA HCV wykryto u 62 dawców bez przeciwciał (17 na 1 milion donacji). Badania RNA HCV u dawców bez przeciwciał zwiększają bezpieczeństwo wirusologiczne przetoczeń. Przy stosowaniu badań technikami biologii molekularnej pulowanego osocza ryzyko zakażenia wynosi 1: 1,16 mln, a przy zastosowaniu badań pojedynczych próbek 1: 2,3 mln.

Tabela IV. Porównanie częstości wykrywania RNA HCV w próbkach osocza dawców bez przeciwciał anti-HCV w różnych krajach

Table IV. The comparison of HCV RNA frequency in plasma samples of anti-HCV negative blood donors in various countries

Kraj	Wielkość puli	Liczba HCV RNA dodatnich / 1 milion donacji
Anglia	48	0,5
Australia	24/1	3
Francja	8-24	0,8
Holandia	24	0
Japonia	50	3,6
Kanada	24	0,5
Niemcy	96	2
Polska	48	17
USA	16-24	4.3

Wczesne wykrycie zakażenia u dawcy może mieć też znaczenie dla przebiegu choroby i daje możliwość wczesnego rozpoczęcia leczenia. Wiadomo, że poziom wirerii w okresie okienka serologicznego jest wyższy niż po pojawieniu się przeciwciał. Można się spodziewać, że w okresie „okienka serologicznego” zwiększone może być ryzyko prze-

Tabela V. Ryzyko zakażenia przez krew przy zastosowaniu różnych metod badania dawców
 Table V. The influence of screening method on the risk of HCV infection by blood transfusion

Wirus	Metoda badania dawców		
	tylko badania anti-HCV	Mini-pule + NAT	pojedyncze donacje NAT
HCV	1 na 200 tys.	1 na 1,6 mln	1 na 2,3 mln

niesienia zakażenia drogami, które generalnie nie są w przypadku HCV uważane za istotne (kontakty seksualne, przeniesienie wertykalne, przeniesienie w obrębie rodziny). Informowanie dawcy o tym, że jest zakażony, ogranicza więc również rozprzestrzenianie się HCV.

Obserwacje dawców z wcześniej wykrytym (w „okienku serologicznym”) zakażeniem HCV pozwalają na badanie naturalnego przebiegu zakażenia u osób bez objawów ostrego zapalenia wątroby typu C i na wykonywanie w tej grupie badań epidemiologicznych. Nasze badania przeprowadzone u tych dawców pozwoliły na ustalenie źródeł zakażenia u części z nich. Dawcy informowani o tym, że wykryto u nich RNA HCV, a nie wykryto jeszcze przeciwciał, przypominali sobie ryzykowne zachowania, czy sytuacje mające miejsce w ciągu ostatnich kilku miesięcy (14). Ustaliliśmy też, że częstość genotypów HCV wśród osób bez przeciwciał jest odmienna niż w grupach przewlekle zakażonych; większa jest częstość genotypów 3a i 4, a mniejsza genotypu 1b (16). Dalsze badania tej grupy powinny odpowiedzieć na pytanie, jaka część tych dawców i po jakim czasie od zakażenia wyeliminuje wirusa. Jak dotąd HCV RNA i przeciwciała anti-HCV w kolejnych próbkach wykryto u wszystkich dawców, a badanie dalszych próbek wykazało eliminację jedynie u dwóch osób spośród 62 osób z tej grupy. Z pewnością więc rozważać należy opracowanie schematu leczenia dla dawców krwi z ostrym, bezobjawowym zakażeniem HCV, których sukcesywnie identyfikować będzie pion krwiodawstwa.

W podsumowaniu należy podkreślić, że metody badań dawców stosowane obecnie na świecie i w Polsce nie tylko zapewniają maksymalne bezpieczeństwo biorcom krwi lecz także spełniają ogromną rolę w identyfikacji osób zakażonych HCV. Dodatkowo, dzięki wprowadzeniu do badań rutynowych w krwiodawstwie metod biologii molekularnej zakażeni dawcy wielokrotni oraz ci, u których wykryto zakażenia w okresie „okienka serologicznego” zostają skierowani do lekarzy z wynikami wykrywania RNA HCV – podstawowego badania potwierdzającego aktualnie toczącą się infekcję.

E Brojer

SEROLOGICAL AND MOLECULAR MARKERS OF HCV INFECTION
 IN POLISH BLOOD DONORS

SUMMARY

The algorithms of blood donor screening for HCV and verification of the results of screening tests are presented. Currently blood donors in Poland are tested for anti-HCV and those with no antibodies are screened using molecular biology methods for HCV RNA.

PIŚMIENNICTWO

1. Sabliński J, Lętowska, Krwiodawstwo i Krwiolecznictwo. Zbiór Przepisów. Warszawa, Ministerstwo Zdrowia, Krajowe Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa, Instytut Hematologii i Transfuzjologii 2000:40.
2. Seyfried H, Grabarczyk P, Brojer E, i in. Wyniki badań przeglądowych przeciwciał anti-HCV i RNA HCV u Polskich dawców krwi. *Przeegl Epidemiol* (złożone do druku).
3. Dufour DR, Talastas M, Fernandez MD, i in. Low-positive anti-hepatitis C virus enzyme immunoassay results: an important predictor of low likelihood of hepatitis C infection. *Clin Chem* 2003;49:479-86.
4. Kiely P, Stewart Y, Castro L. Analysis of voluntary blood donors with biologic false reactivity on chemiluminescent immunoassays and implications for donor management. *Transfusion* 2003;43:584-90.
5. Theilmann L, Blazek M, Goeser T, i in. False-positive anti-HCV tests in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1990;335:1346.
6. Simonsen L, Buffington J, Shapiro CN, i in. Multiple false reactions in viral antibody screening assays after influenza vaccination. *Am J Epidemiol* 1995;141:1089-96.
7. Alonso C, Pedroso ML, de Sanjose S, i in. Hepatitis C virus among blood donors: follow-up study. *Transfusion* 1994;34:527-30.
8. Moraczewska Z, Mikulska M, Brojer, E i in. Wykrywanie RNA HCV wśród polskich dawców krwi oraz w preparatach osoczo pochodnych. *Acta Haematol Pol* 2000; 31:391-397.
9. Lemaire JM, Courouce AM, Defer C, i in. HCV RNA in blood donors with isolated reactivities by third-generation RIBA. *Transfusion* 2000;40:867-70.
10. Rodger AJ, Roberts S, Lanigan A, i in. Assessment of long-term outcomes of community-acquired hepatitis C infection in a cohort with sera stored from 1971 to 1975. *Hepatology* 2000; 32(3):582-7.
11. Eglin R. Implementation of genome amplification technology for HCV RNA detection. *Transfusion Medicine* 2002;12:265-73.
12. Brojer E, Liszewski G, Niżnik, i in. Detection of HCV core antigen in HCV RNA positive, anti-HCV negative blood donations from Polish blood donors. *Transfusion* 2001;41:304-305.
13. Jarvis LM, Simmonds P. Scottish experience with NAT. *Transfusion Medicine* 2002;12:259-264.
14. Brojer E, Lętowska M, Gronowska A, i in. Rozpoznanie wczesnego etapu zakażenia HCV u dawców krwi poprzez badanie RNA HCV – nowe wyzwanie dla transfuzjologii i hepatologii. *Pol Merk Lek* 2004;17:321-325.
15. Brojer E, Lętowska M, Gronowska A. Nucleic acid testing for virus screening in Polish blood donors. *Transfus Med* 2004;14(1):79-80.
16. Brojer E, Gronowska A, Medyńska J, i in. The HCV genotype frequency in HCV RNA positive/anti-HCV negative blood donors identified in NAT screening program in Poland. *Transfusion* 2004;44(12):1706-10.
17. Stramer SL, Glynn SA, Kleinman SH, i in. Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative blood donors by nucleic acid-amplification testing. *N Engl J Med* 2004; 351(8):760-8.

Adres autora:

Prof. dr hab. Ewa Brojer
Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej
Instytutu Hematologii i Transfuzjologii
ul. Chocimska 5, 00-957 Warszawa
e-mail: ebrojer@ihit.waw.pl