

Halina Seyfried, Ewa Brojer, Piotr Grabarczyk, Magdalena Rosińska, Agnieszka Gronowska, Magdalena Łętowska
Zespół ds. Wirusologicznych Badań Epidemiologicznych Regionalnych Centrów
Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa

ANALIZA CZĘSTOŚCI WYKRYWANIA MARKERÓW ZAKAŻENIA WIRUSEM ZAPALENIA WĄTROBY TYPU C (HCV) U POLSKICH DAWCÓW KRWI W LATACH 1994-2003

Zakład Transfuzjologii i Organizacji Służby Krwi Instytut Hematologii
i Transfuzjologii, Warszawa,
Kierownik: Magdalena Łętowska

Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej
Instytutu Hematologii i Transfuzjologii
Kierownik: Barbara Żupańska

Zakład Epidemiologii, Państwowy Zakład Higieny, Warszawa
Kierownik: Andrzej Zieliński

Przedstawiono wyniki przeglądowych badań HCV wykonanych metodami immunoenzymatycznymi i molekularnymi u polskich dawców krwi. Częstość wykrywania anty-HCV w latach 1994-2004 wynosiła średnio 0,48%. W latach 2002-2003 RNA HCV wykryto w 51 spośród 2 915 299 donacji z ujemnymi wynikami testów anty HCV (0,002%). Częstość markerów zakażenia HCV jest w Polsce wysoka w porównaniu z większością krajów europejskich.

Słowa kluczowe: anty-HCV, RNA HCV, dawcy krwi
Key words: anti-HCV, RNA HCV, blood donors

Zespół ds. Wirusologicznych Badań Epidemiologicznych Regionalnych Centrów Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa: mgr Alina Lipska – Białymstok, mgr Barbara Zalewicz – Bydgoszcz, mgr Barbara Wyrwińska – Gdańsk, mgr Maciej Marek – Kalisz, mgr Stanisław Dyląg – Katowice, lek. Zdzisława Sitarz-Żelazna – Kielce, mgr Jolanta Kuśmierczyk – Kraków, lek. Hanna Radwan-Wieczorek – Lublin, mgr Bogumiła Sękowska – Łódź, lek. Grażyna Kula – Olsztyn, mgr Iwona Rajca-Biernacka – Opole, mgr Maria Krug-Janiak – Poznań, mgr Joanna Myrczek-Kulbaka – Raciborz, mgr Halina Kaczor – Radom, mgr Anna Krygowska – Rzeszów, mgr Anna Dobrecka – Słupsk, mgr Dorota Stepień-Razzu – Szczecin, mgr Danuta Kwapisz – Wałbrzych, mgr Dorota Malka – Warszawa, mgr Ewa Świątek – Wrocław, lek. Monika Fabisz-Kolodzińska – Zielona Góra.

WSTĘP

Badania przeciwciał anty-HCV u dawców krwi na świecie i w Polsce wykonuje się od początku lat 90-tych (1). Dzięki nim odsuwa się od oddawania krwi osoby przewlekle zakażone oraz te, które przebyły zakażenie. Badanie to nie pozwala na wykrycie zakażenia w tzw. okienku serologicznym, które jest w zakażeniu HCV długie; średnio wynosi 70 dni, lecz może przekraczać rok (2). W tym okresie, już w dwa tygodnie po zakażeniu, w osoczu wykrywalne jest RNA wirusa (3-6). Badania RNA HCV są trudne technicznie, lecz w końcu lat 90-tych dostosowano je do badań masowych u dawców krwi i obecnie są stosowane jako badania rutynowe (4-6). Mniej czułym sposobem identyfikacji zakażonych bez przeciwciał, jest badanie antygeny rdzeniowego HCV (7,8).

U wszystkich dawców, przed każdym oddaniem krwi wykonuje się badania przeciwciał anty-HCV testami immunoenzymatycznymi (EIA). Gdy wynik jest dodatni, badanie powtarza się dwukrotnie i gdy przynajmniej jedno powtórzenie daje wynik dodatni, dawcę odsuwa się od oddania krwi. Weryfikacja wyników przeciwciał anty-HCV, oparta na badaniu RNA HCV i przeciwciał testem uzupełniającym (np. RIBA) wykonywana jest jedynie u dawców wielokrotnych. Kandydaci na dawców, u których uzyskano powtarzalnie dodatnie wyniki testów przeglądowych, kierowani są do dalszej diagnostyki do lekarzy pierwszego kontaktu.

Badania markerów HCV u krwiodawców stanowią źródło analiz epidemiologicznych, ze względu na dużą liczebność badanej populacji. W Polsce pobiera się rocznie około miliona donacji. Kryteria, jakie musi spełniać dawca krwi, określa odpowiednie rozporządzenie Ministra Zdrowia (9) oraz zbiór przepisów (10). Krwiodawstwo w Polsce jest dobrowolne i nieodpłatne, a u podstaw decyzji o oddawaniu krwi leżą przede wszystkim pobudki altruistyczne (11). Każdy dawca jest badany przez lekarza, ma wykonane badanie aktywności aminotransferazy alaninowej (ALT) i wypełnia kwestionariusz, na podstawie którego analizowane są potencjalne możliwości zwiększonego ryzyka zakażenia.

Celem pracy jest analiza częstości wykrywania przeciwciał anty-HCV w badaniach przeglądowych u polskich dawców krwi, w okresie od 1994 roku do 2003 oraz częstości wykrywania RNA HCV w próbkach pobranych od dawców bez przeciwciał w latach 2000-2003.

MATERIAŁ I METODY

Schemat zbierania danych. Badania dawców wykonywano w 21 Regionalnych Centrach Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (RCKiK). Po zakończeniu roku kalendarzowego przesyłały one do Instytutu Hematologii i Transfuzjologii (IHIT) następujące dane: liczba kandydatów na dawców (dawców pierwszorazowych) oraz dawców wielokrotnych, którzy oddali krew oraz liczba dawców z powtarzalnie dodatnimi wynikami testów przeglądowych EIA anty-HCV. W pracy analizowano dane z lat 1994-2003 obejmujące 4 233 119 dawców: 2 519 831 dawców wielokrotnych i 1 713 288 kandydatów na dawców.

Dodatkowo w latach 2000-2003 analizowano częstość wykrywania RNA HCV lub antygeny rdzeniowego HCV w 2 915 299 próbkach pobranych od dawców bez przeciwciał. Ponieważ u wszystkich dawców z wykrytym antygenem potwierdzono obecność RNA HCV, dane analizowano łącznie. W latach 2000-2001 rejestrowano liczbę badanych donacji i liczbę dawców w okienku serologicznym, a w latach 2002-2003 uwzględniono też liczbę badanych dawców.

METODYKA BADAŃ PRZEGLĄDOWYCH U DAWCÓW

Badania przeciwciał anty-HCV. Stosowano testy immunoenzymatyczne trzeciej generacji EIA 3.0: w latach 1994-1996 firmy Abbott i Ortho Clin Diag.; 1997-1998 Abbott, Ortho Clin Diag i Sanofi Pasteur, 1999-2003 Ortho Clin Diag.

Badania w celu wykrycia zakażenia HCV w okienku serologicznym. Badania molekularne wykonywano dwiema metodami: 1) metodą PCR, przy użyciu testu Cobas Ampliscreen (Roche Diag) w próbkach osocza złanych od 48 dawców (tzw. mini-pule), 2) techniką TMA (ang.: transcription mediated amplification) w pojedynczych próbkach osocza przy użyciu testu Procleix HCV/HIV1 (Chiron Corp). Badania antygenu rdzeniowego HCV wykonywano testem HCV cAg Ortho Clin Diag.

Analiza statystyczna. Częstość wykrywania anty-HCV oceniono w oparciu o regresję Poissona. Przyjęto 5% poziom istotności statystycznej.

WYNIKI

Wykrywanie przeciwciał anty-HCV. W tabeli I przedstawiono wyniki uzyskane u kandydatów na dawców i dawców wielokrotnych. Przeciwciała wykryto ogółem u 20 349 dawców (0,48%), w tym u 14 683 (0,86%) kandydatów na dawców i u 5 666 (0,23%) dawców wielokrotnych. Obserwowane różnice są statystycznie istotnie ($p = 0,0001$).

Tabela I. Wykrywanie anty-HCV u dawców krwi w Polsce, w latach 1994- 2003

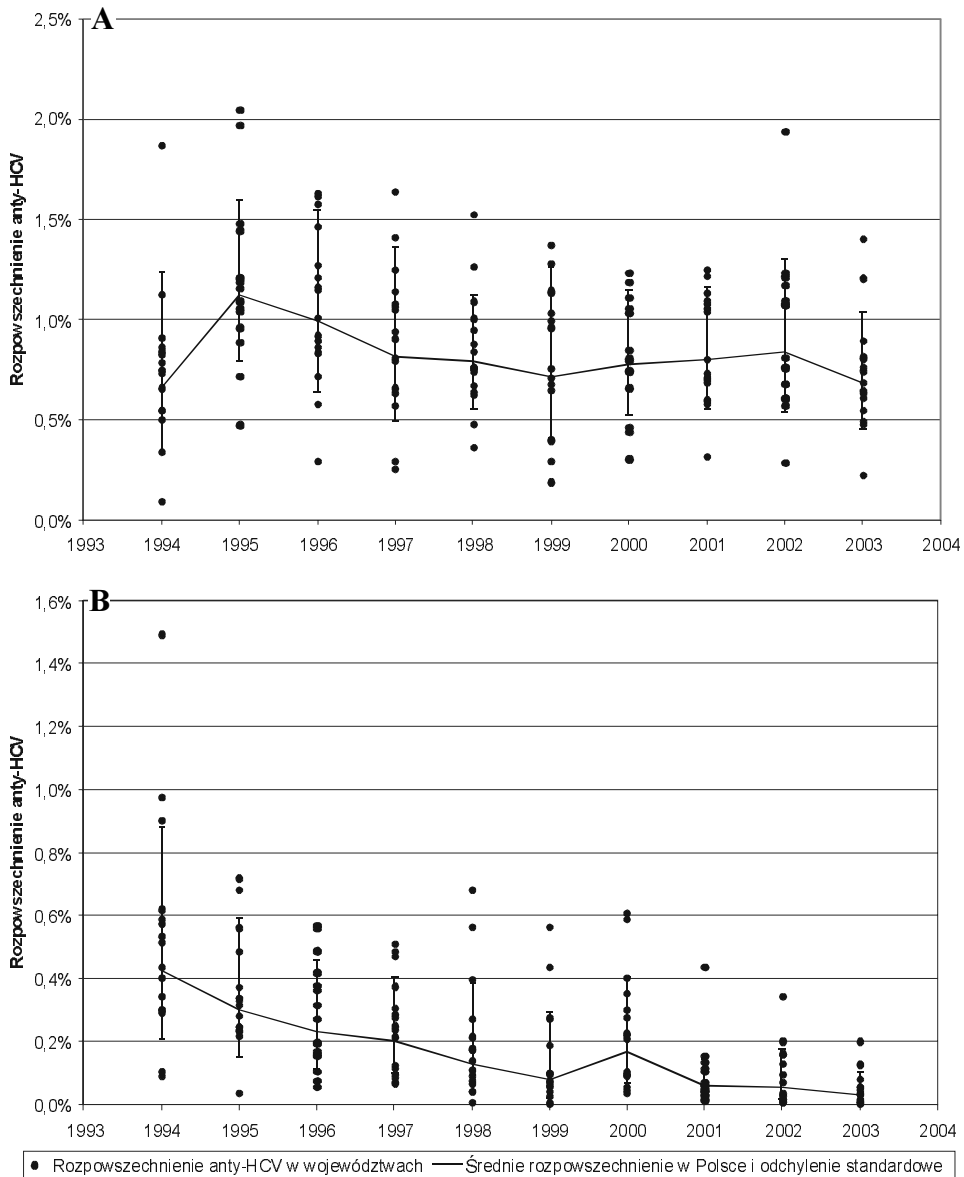
Table I. Anti-HCV detection in Polish blood donors, in 1994-2003

	Liczba przebadanych dawców	Ogólna liczba (odsetek) dawców, u których wykryto anty-HCV	Roczna liczba (odsetek) dawców z anty-HCV		
			średnia	najmniejsza	największa
Kandydaci na dawców	1 713 288	14 683 (0,86%)	1468 (0,86%)	1246 (0,68%)	1665 (1,10%)
Dawcy wielokrotni	2 519 831	5 666 (0,23%)	566 (0,23%)	100 (0,04%)	1356 (0,52%)
Razem	4 233 119	20 349 (0,48%)			

Średnio, w przeliczeniu na rok przeciwciała wykrywano u 1468 kandydatów na dawców i u 566 dawców wielokrotnych (tab I). Liczba dawców z powtarzalnie dodatnimi wynikami testów przeglądowych wśród kandydatów na dawców wynosiła od 1 246 do 1 665/rok (0,68% do 1,1%), a wśród dawców wielokrotnych od 100 do 1 356 (0,04% do 0,52%).

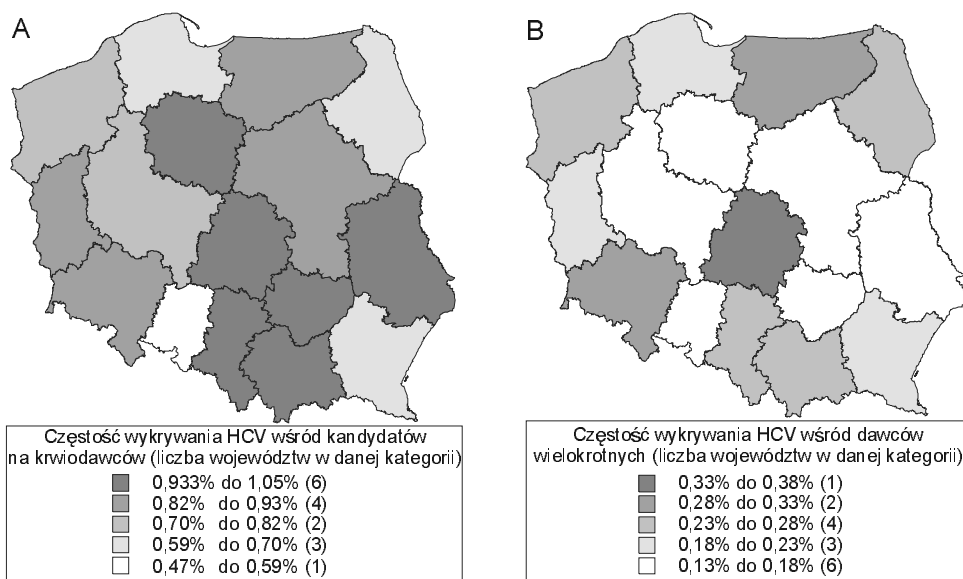
Częstość wykrywania przeciwciał w kolejnych latach, w różnych województwach, przedstawiono na rycinie 1, u kandydatów na dawców (A) i dawców wielokrotnych (B). Wśród kandydatów na dawców, od 1996 roku obserwuje się spadek częstości występowania przeciwciał anty-HCV o 4% rocznie (95% przedział ufności 2-6%, $p=0,0001$). Wśród dawców wielokrotnych spadek wykrywalności jest widoczny od 1994 roku i wynosi rocznie 21% (95% przedział ufności 17-24%, $p=0,0001$).

W obydwu grupach dawców ujawniły się istotne statystycznie różnice między województwami ($p=0,0003$ dla kandydatów na dawców i $p=0,0005$ dla dawców wielokrotnych). Rozkład rozpowszechnienia wykrywania przeciwciał anti-HCV w różnych województwach wśród dawców wielokrotnych i kandydatów na dawców nie pokrywa się. Wśród kandyda-



Ryc. 1. Częstość wykrywania przeciwciał anti-HCV wśród kandydatów na dawców (A) i wśród dawców wielokrotnych (B) w Polsce w latach 1994-2003

Fig. 1. Anti-HCV detection in candidates for donors (A) and in regular donors (B) in Poland in 1994-2003



Ryc. 2. Średnie rozpowszechnienie anti-HCV wśród kandydatów na dawców (A) i dawców wielokrotnych (B) w latach 1994-2003, według województw

Fig. 2. Prevalence of anti-HCV in candidates for blood donors (A) and regular donors (B) between 1994-2003 in various regions of Poland

tów najwyższe rozpowszechnienie obserwuje się w województwach: śląskim (1,0%), małopolskim (1,0%), świętokrzyskim (1,0%), łódzkim (1,0%), lubelskim (1,0%) i kujawsko-pomorskim (1,0%); wśród dawców wielokrotnych, w łódzkim (0,4%) oraz podlaskim (0,3%) i dolnośląskim (0,3%).

Wykrywanie RNA HCV u dawców bez przeciwciał (tab II). RNA HCV wykryto u 51 dawców spośród 2 915 299 próbek osocza (0,002%). W latach 2002 i 2003 częstość dawców w okienku serologicznym w przeliczeniu na liczbę przebadanych dawców wynosiła odpowiednio 0,07% i 0,002% (średnio 31/ 816 875; 0,004%).

Tabela II. Częstość wykrywania RNA HCV u dawców bez przeciwciał

Table II. HCV RNA detection in anti-HCV negative blood donors

Rok	Liczba próbek osocza		Liczba dawców	
	badanych	RNAHCV (+)/ anti-HCV (-) liczba (%)	badanych	RNAHCV (+)/ anti-HCV (-) liczba (%)
2000	378 710	11 (0,0020)	Nie analizowano	
2001	621 528	9 (0,0015)		
2002	951 812	24 (0,003)	398 055	24 (0,07)
2003	963 249	7 (0,0007)	418 820	7 (0,002)
Suma	2 915 299	51 (0,002)	816 875	31 (0,004)

DYSKUSJA

Częstość występowania dodatnich wyników testu przeglądowego wykrywającego przeciwciała anti-HCV wynosiła wśród polskich dawców krwi w latach 1994-2003 średnio 0,48%. Podobnie jak w innych krajach (12) jest ona niższa wśród dawców wielokrotnych (0,23%) niż wśród kandydatów na dawców (0,86%). Porównanie z danymi Rady Europy (12) wykazuje, że częstość anti-HCV u polskich dawców jest wyższa niż w wielu krajach Europy (Wielka Brytania, Szwecja, Finlandia). Są też regiony, gdzie jest ona zbliżona (Włochy, Grecja) lub znacząco wyższa (Japonia, Filipiny, kraje byłego Związku Radzieckiego) do obserwowanej w Polsce. Najwyższą częstość wykrywania przeciwciał anti-HCV u dawców (1,4%: od 0,3% do 4% w różnych regionach Polski) obserwowano zaraz po wprowadzeniu testów serologicznych (1).

W ciągu analizowanych 10 lat wśród kandydatów na dawców i dawców wielokrotnych obserwuje się tendencję spadkową częstości wykrywania przeciwciał. Wynika to z wnikliwszych zasad kwalifikacji dawców do oddania krwi oraz z większej wiedzy dawców o ryzyku przeniesienia wirusów przez ich krew. Po roku 2000 tendencję tę możemy wiązać z wprowadzeniem technik molekularnych umożliwiających wykrycie zakażenia przed pojawieniem się przeciwciał. Dawcy wielokrotni, którzy ulegli zakażeniu HCV, już wtedy zostają na stałe odsunięci od oddawania krwi

Częstość wykrywania zakażenia HCV w okienku serologicznym jest w Polsce około 10 razy większa niż w krajach Europy zachodniej i północnej (4-6). Wczesne wykrycie zakażenia HCV ma duże znaczenie dla ograniczenia rozprzestrzeniania się HCV. Daje możliwość wczesnego podjęcia leczenia, które według ostatnich analiz ma dużą skuteczność (15). Dawcy bez przeciwciał, z wykrytym RNA HCV zakazili się najprawdopodobniej nie dalej niż 6 miesięcy wcześniej. Dzięki wywiadam epidemiologicznym udaje się u wielu z nich ustalić źródła zakażenia, które zostały przez nich pominięte (zapomniane, nieuświadomione) w czasie rozmowy z lekarzem (13-14).

Z punktu widzenia analiz epidemiologicznych najważniejsze znaczenie mają wyniki badań u kandydatów na dawców, które stanowią odbicie częstości wykrywania przeciwciał anti-HCV wśród osób zdrowych spoza grup ryzyka. Częstość wykrywania przeciwciał w ogólnej populacji jest prawdopodobnie wyższa, a wśród wielu grup chorych, na przykład z oddziałów hematologicznych (16) znacząco wyższa. W polskich badaniach przeprowadzonych wśród ochotników wynosiła ona 1,9% (17). Badania u ochotników mogą być też obarczone błędem, ponieważ chętniej uczestniczą w nich osoby mające podejrzenia co do swojego stanu zdrowia.

Analizując prezentowane w tej pracy dane należy mieć na uwadze, że częstości dodatnich wyników badań anti-HCV w testach przeglądowych nie przekłada się jednoznacznie na rozpowszechnienie zakażeń HCV. Większość wyników testu EIA wśród dawców to wyniki tzw. „słabo dodatnie” (wartość stosunku ekstynkcji próbki badanej i tła (S/C) nie przekracza 4,0) (18). Prawdopodobieństwo wykrywania RNA HCV wśród osób z takimi wynikami jest niskie i wynosi około 10% (19). Część dodatnich wyników testów przeglądowych ma charakter tzw. wyników biologicznie fałszywie dodatnich (20, 21).

Dla przeciwciał anti-HCV nie ma wiarygodnych testów potwierdzających swoistość przeciwciał, jakimi są testy Western Blot dla przeciwciał anti-HIV. Testy oparte na analogicznej technice (RIBA, LiaTek) mają pomocnicze znaczenie dla potwierdzania swoisto-

ści przeciwciał. Wykrywanie RNA HCV potwierdza aktualnie toczącą się infekcję, lecz wynik może być ujemny u osób zakażonych, u których RNA nie jest obecne w osoczu, a jest obecne w innych tkankach czy narządach (22). Z kolei u osób, które uległy wyleczeniu przeciwciała anti-HCV pozostają jako marker przebytego zakażenia.

H Seyfried, E Brojer, P Grabarczyk, M Rosińska, A Gronowska, M Lętowska,
Viral Study Group of Regional Blood Transfusion Centers

PREVALENCE OF HEPATITIS C VIRUS MARKERS IN POLISH
BLOOD DONORS IN 1994-2003

SUMMARY

The results of serological and molecular screening tests for HCV performed by Polish Blood Transfusion Service between 1994 and 2003 are presented. Serological tests were performed in 4 233 119 donors. The average frequency of anti-HCV was 0,48%. The frequency of anti-HCV was higher in first time donors (0,86%) than in repeat donors (0,23%). In both groups a decreasing trend in anti-HCV frequency was observed – 4% annually in the group of candidates for donors and 21% annually in repeat donors. Molecular methods for identification of HCV infection in serologic window period were introduced in 2000. RNA HCV was detected in 51 out of 2 915 299 (0,002%) anti-HCV negative plasma samples. The frequency of HCV infection markers is in Poland higher than in most European countries. However, a decreasing tendency of HCV markers detection, especially in repeat donors is observed.

PIŚMIENNICTWO

1. Moraczewska Z, Kacperska E, Seyfried H. Ocena testów przeglądowych i uzupełniających do wykrywania przeciwciał anti-HCV. *Acta Haematol Pol* 1993; 24: 273-280.
2. Peoples B, i in. Prolonged antibody-negative HCV viremia in a US blood donor with apparent HCV transmission to a recipient. *Transfusion* 2000; 40: 1280-81.
3. Glynn SA, Wright DJ, Kleinman SH, i in. Dynamics of viremia in early hepatitis C virus infection. *Transfusion* 2005; 45: 994-1092.
4. 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.
5. Brojer E, Lętowska M, Gronowska A. Nucleic acid testing for virus screening in Polish blood donors. *Transf Med* 2004 Feb; 14: 79-80.
6. 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; 19; 351: 760-8.
7. Brojer E, Liszewski G, Niżnik, i in. Detection of HCV core antigen in RNA HCV positive, anti-HCV negative blood donations from Polish blood donors. *Transfusion* 2001, 41: 304-305.
8. Lętowska M, Brojer E, Mikulska M, i in. Hepatitis C core antigen in Polish blood donors. *Transfusion* 2004; 44: 1067-71.
9. Kryteria kwalifikowania dawców do oddawania krwi pełnej i jej składników. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z 18 kwietnia 2005 w sprawie pobierania krwi od kandydatów na dawców krwi i dawców krwi. *Dz.U.Nr 79, poz.691*.
10. Sabliński J, Lętowska M. Krwiodawstwo i Krwiolecznictwo. Zbiór Przepisów, Warszawa: Ministerstwo Zdrowia, Krajowe Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, 2000:40.

11. Rosiek A, Rzymkiewicz L, Owczarska K, i in. Charakterystyka osób oddających krew honorowo w czasie ekip wyjazdowych, organizowanych przez Instytut Hematologii i Transfuzjologii – analiza danych demograficznych, motywacji i wybranych badań. *Acta Haematol Pol.* 2005; 36: 197-206.
12. van der Poel CL, Janssen MP. The collection, testing and use of blood and blood products in Europe, in 2003. Final report. Council of Europe Publishing 2005
13. Orton SL, Stramer SL, Dodd RY i in. Risk factors for HCV infection among blood donors confirmed to be positive for the presence of RNA HCV and not reactive for the presence of anti-HCV. *Transfusion* 2004; 44 : 275-81.
14. Brojer E, Gronowska A, Medyńska J, i in. The HCV genotype frequency in RNA HCV positive/anti-HCV negative blood donors identified in NAT screening program in Poland. *Transfusion* 2004, 44: 1706-10.
15. Jaeckel E, i in. Treatment of acute hepatitis C with interferon alfa-2b. *N Engl J Med* 2001; 345: 1452-7.
16. Głowska-Moraczewska Z, Brojer E, Kacperska E, i in. Analiza częstości i źródeł zakażeń HCV u chorych hematologicznych. *Acta Haematol Pol* 1997, 28, 283-288.
17. Bielawski K, Wlasiuk M, Truskolawska M, i in. HCV infection in Poland. *Arch Med Res* 2000; 31: 532-5.
18. Grabarczyk P, Brojer E, Medyńska J, i in. HCV RNA and HIV RNA detection in blood donors with various results of anti-HCV and anti-HIV EIA. *Przyjęte do Transf. Med.*
19. 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.
20. Theilmann L, Blazek M, Goeser T, i in. False-positive anti-HCV tests in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1990; 335: 1346.
21. 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.
22. Vargas HE, Laskus T, Radkowski M, i in. Detection of hepatitis C virus sequences in brain tissue obtained in recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Liver Transpl* 2002; 8: 1014-9.

Otrzymano 9.06 2005 r.

Adres autorów:

Prof. Dr hab. Halina Seyfried
Instytut Hematologii i Transfuzjologii,
ul. Chocimska 5, 00-957 Warszawa
tel. (22) 849 36 51; fax (22) 849 69 52