

PRINCIPI NAT TEHNOLOGIJE SA OSVRTOM NA REZULTATE INSTITUTA ZA TRANSFUZIOLOGIJU VMA U PERIODU OD 2007. DO 2011. GODINE

Nemanja Borovčanin, Dušan Vučetić, Gorana Stamenković¹,
Miodrag Jocić, Dragana Jovičić, Bela Balint
Institut za transfuziologiju VMA, Beograd
¹Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Beograd

SAŽETAK

Da bi testiranje nukleinskih kiselina bilo moguće, neophodno je izdvojiti ih iz virusa (ekstrakcija), zatim umnožiti (amplifikacija), obeležiti specifičnim probama (hibridizacija) i detektovati. To se obavlja korišćenjem metode „Polymerase Chain Reaction” (PCR) ili lančane reakcije polimeraze koja nam omogućava da umnožimo deo virusnog genoma do količine koju je moguće detektovati. Od 1943. godine, kada je transmisija hepatitisa preko transfuzije prvi put prijavljena, do početka 21. veka, kada je masovno uvedena NAT tehnologija (eng. Nucleic-acid Amplification Testing – testiranje amplifikovanih nukleinskih kiselina), došlo je do značajnog poboljšanja u otkrivanju virusa uzročnika hematogenih transmisivnih bolesti. U ovom radu dati su osnovni principi NAT-a, odnosno detekcije genetskog materijala virusa uzročnika hepatitisa tipa B, C i virusa humane imunodeficijencije (HIV-a). Takođe, opisani su NAT rezultati dobijeni kod uzoraka krvi davalaca u Institutu za transfuziologiju VMA u periodu od aprila 2007. do juna 2011. godine. Od 50.369 testiranih davalaca u pulu, detektovana su dva HCV RNK pozitivna uzorka, jedan HBV DNK pozitivan uzorak, a za HIV RNK svi pulovi su bili negativni. Od 2.689 pojedinačno obavljenih NAT testiranja, najviše pozitivnih bilo je za HBV DNK (135 uzoraka), zatim za HCV RNK (108 pozitivnih) i 7 pozitivnih za HIV RNK. Za sve navedene uzorke paralelno su rađeni određeni enzimoimunski i potvrdni testovi. Komparacija rezultata primenjenih testova na našim ispitanim uzorcima potvrdila je opravdanost primene NAT-a, posebno prilikom korišćenja manje specifičnih i osetljivih enzimoimunskih testova.

Ključne reči: NAT, PCR, HBV, HCV, HIV

Uvod

Kratak uvod u problematiku testiranja davalaca krvi na prisustvo infektivnih agenasa

Prenošenje hepatitisa putem transfuzije prvi put je prijavljeno 1943. godine (1, 2). Hepatitis koji se prenosi oro-fekalnim putem izazivan je virusom

hepatitisa tipa A (HAV), dok je onaj koji se prenosi krvlju/produktima od krvi izazivan virusom hepatitisa tipa B (HBV). Blumberg je 1963. godine, identifikovao HBV, što je bila prva identifikacija nekog od virusa uzročnika hepatitisa (3). U početku je nazivan „australijskim antigenom”, s obzirom da je prvobitno opisan kod australijskih Aboridžina i javljao se kod bolesnika sa leukemijom. Epidemiološki podaci pokazuju da čak preko 300 miliona ljudi (oko 5% svetske populacije) nosi ovaj virus (4). Učestalost HBV infekcije kreće se od 8 do 15% (Daleki istok, Srednji istok, Afrika i delovi Južne Amerike), do manje od 2% (SAD, Kanada, severna Evropa i delovi Južne Amerike). Godišnje se prijavi oko 4 miliona slučajeva

Kontakt osoba:
dr Nemanja Borovčanin
Institut za transfuziologiju,
Vojnomedicinska akademija, Beograd
e-mail: drsky2@gmail.com

akutnog hepatitisa tipa B. Milion ljudi umire godišnje od posledica hronične HBV infekcije i komplikacija izazvanih ovim virusom (4, 5).

Posle otkrića HAV-a, HBV-a kao i enzimoimunskih (Enzyme Link Immunosorbent Assay – ELISA) testova za njihovo otkrivanje, preostao je veliki broj bolesnika sa kliničkim hepatitisom koji nije bio izazvan njima, te je stoga nazvan non-A, non-B (NANB) hepatitis. Ovaj hepatitis je povezivan sa intravenskim narkomanima, terapijom derivatima pulovane plazme, kao i sa transfuzijama krvi. Posle kloniranja genoma 1989. godine, virus NANB hepatitisa je nazvan virus hepatitisa tipa C (HCV) (6). Godišnje se 2 miliona ljudi zarazi ovim virusom. Prevalenca varira od 2% u Severnoj Americi, Evropi i Australiji, do 5% u Africi (7). HCV se predominantno prenosi putem krvi. Pre uvođenja anti-HCV testova i primaoci transfuzija su bili pod velikim rizikom.

Virus humane imunodeficijencije (HIV) otkriven je sredinom osamdesetih godina XX veka, gotovo istovremeno od strane dve grupe naučnika (na čelu sa L. Montanje u Francuskoj i R. Galo u SAD). Postoje dva tipa virusa humane imunodeficijencije: HIV-1 i HIV-2. Prvi, HIV-1 sadrži dva podtipa: M (main – glavni) i O (outlier – sporedni). M podtip se ispoljava u 11 varijanti (od A do K). Varijanta B je najčešća u Evropi i Americi. Podtip O je prvobitno pronađen u Kamerunu i pretpostavlja se da je oko 1–2% HIV pozitivnih u zapadnoj Africi zaraženo ovim virusom. HIV-2 je otkriven 1985. godine, u zemljama zapadne Afrike i njegovo prisustvo van ove regije je neuobičajeno. Postoji značajan stepen homologije između ova dva virusa, sa sličnom kliničkom slikom, mada bolest izazvana HIV-2 obično ima blaži oblik. U SAD, samo su 2 davaoca krvi bila pozitivna na HIV-2, a čak 4.000 na HIV-1 od 50 miliona donacija. Transfuzijom je inficirano oko 4% HIV pozitivnih u Velikoj Britaniji i SAD, a oko 2–5% u celom svetu (8).

Poslednjih godina u pojedinim zemljama postoji značajan rizik od prenosa arbovirusa (eng. **arthropod-borne**) putem transfuzije. Virus iz ove grupe mogu izazvati klinički značajne bolesti kod ljudi. To se pre svega odnosi na virus zapadnog Nila i viruse *Chikungunya* i *Dengue*. Virus zapadnog Nila detektovan je 1999. godine u SAD, gde se u roku od tri godine raširio do Majamija od inicijalnog žarišta u Njujorku. Kao rezultat toga od 2003. godine, NAT je obavezan u SAD i Kanadi i za virus zapadnog Nila (9, 10).

Kratak pregled savremenih načina testiranja

Danas se svi davaoci krvi i hemoprodukata prvo testiraju savremenim ELISA testovima na: HBsAg (površinski antigen virusa hepatitisa tipa B), anti-HCV antitela i/ili antigen (anti-HCV, HCV Ag/At) i anti-HIV antitela i/ili antigen (anti-HIV 1+2, HIV Ag/At). U zemljama sa visokom prevalencom hepatitisa tipa B, HBV NAT se uvodi u rutinsku primenu krajem

prošlog veka. Koppelman i saradnici su objavili veliku evropsku multicentričnu studiju o primeni NAT-a za screening davalaca (11). Oni su zaključili da ID (eng. Individual Donation – pojedinačno testiranje) ili MP (eng. Mini Pool – testiranje pula od nekoliko uzoraka) HBV NAT ima malo uticaja na rezidualni rizik kod HBV infekcije, u zemljama sa niskom stopom prevalencije. Senzitivnost MP NAT HBV iznosi 100 kopija/mL (25 IU/mL), a za ID NAT HBV iznosi 20 kopija/mL (5 IU/mL) (11).

U SAD, Japanu, Nemačkoj i Francuskoj 1999. godine uvedeno je rutinsko testiranje jedinica krvi uz pomoć MP HCV NAT. Jedna od najvažnijih prednosti NAT je u detekciji virusa kod davalaca krvi koji se nalaze u periodu „prozora“, odnosno kod kojih nije došlo do serokonverzije tj. pojave antitela na odgovarajući virus (12–14). FDA (eng. Food and Drug Administration – Uprava za hranu i lekove SAD) zahteva da senzitivnost testa bude 100 kopija/mL za ID HIV NAT i 5000 kopija/mL za MP HIV NAT. Zahvaljujući primeni najsavremenijih testova za skrining davalaca krvi (HIV Ag/At i NAT), kao i aplikaciji metoda za inaktivaciju virusa u plazmi i trombocitima, praktično je eliminisan rizik od prenosa HIV-a putem transfuzije (11, 15).

Za određivanje konačnog statusa davalaca koji su bili pozitivni prilikom testiranja neophodno je uraditi i potvrdni test. Većina razvijenih zemalja imaju mogućnost da na adekvatan način urade potvrdni test kod reaktivnih uzoraka. Potvrđivanje HBsAg bi se zasnivalo na alternativnom enzimoimunom testu sa specifičnom neutralizacijom anti-HBsAt. Rekombinantni imunoblot test (eng. Recombinant Immunoblot Assay) RIBA HCV-3 je „zlatni standard“ za potvrdu prisustva anti-HCV antitela. Anti-HIV 1 aktivnost se potvrđuje korišćenjem HIV 1 Western blota, anti-HIV 2 korišćenjem HIV 2 Western blota, a p24 antigen testom neutralizacije (16).

Definicije PCR i NAT testiranja

Polymerase Chain Reaction – lančana reakcija polimeraze (PCR) se definiše kao *in vitro* metod za produkciju velike količine specifičnog fragmenta DNK (dezoksiribonukleinske kiseline)/RNK (ribonukleinske kiseline), poznate dužine i sekvence, iz male količine uzorka. Ova enzimska reakcija je osnova NAT tehnologije, kojom se umnožava deo genetskog materijala (nukleinska kiselina odnosno DNK ili RNK) virusa krvno prenosivih bolesti. Detekcija umnoženih genomskih fragmenata virusa danas se zasniva na hibridizaciji sa specifičnim probama. Upotreba proba omogućila je automatizaciju procesa detekcije, povećala je specifičnost/senzitivnost NAT i postavila osnov za razvoj tzv. *Real time* PCR tehnologije za kvantifikaciju viriona (17, 18).

Istorijski razvoj testiranja davalaca krvi

Prevenција transmisije virusnih hepatitisa preko transfuzije započeta je ispitivanjem davalaca da li su ranije bolovali od hepatitisa (žutice). Virus izazivač hepatitisa tipa B (odnosno njegov površinski antigen – HBsAg) laboratorijski je dokazan 1969. godine, a kao test uveden u transfuziološku praksu 1971. godine. Da bi se smanjilo prenošenje NANB hepatitisa, 1986. godine su uvedeni tzv. „surogat“ testovi (određivanje nivoa alanin aminotransferaze – ALT) kod davalaca, kao i antitela na „core“ antigen HBV-a (anti-HBc). Specifičan test za HCV nije bio dostupan do 1990. godine, kada su uvedeni anti-HCV testovi prve generacije koji su sadržali klonirani HCV antigen. Sa uvođenjem anti-HCV testiranja, ALT postaje nepotreban, naročito posle implementacije NAT tehnologije. Anti-HBc se izbacuje kao „surogat“ test za HCV, ali se i dalje koristi kao drugi marker za HBV, naročito kod nosilaca gde HBsAg nedostaje (19).

Kod skrininga davalaca krvi, testiranje na HBsAg je „zlatni standard“, i ukoliko je davalac i potvrdno pozitivan on se trajno odbija od donacije krvi. Test za anti-HBc je prvo uveden u SAD, kao „surogat“ test za nosioce virusa NANB hepatitisa. Posle otkrića HCV-a i uvođenja anti-HCV testiranja, testiranje na anti-HBc je nastavljeno u nekim zemljama, i izvodi se kod HBsAg negativnih davalaca. Testiranje na HBsAg se obično izvodi ELISA testovima, a u poslednje vreme koristi se osetljivija metoda očitavanja rezultata putem hemiluminescencije (20). Ova metoda se rutinski koristi u SAD, Kanadi, Evropi, delu Azije a takođe i u Srbiji (Institut za transfuziologiju VMA, Institut za transfuziju krvi Srbije i Zavod za transfuziju krvi Vojvodine). Od uvođenja testiranja na HBsAg (1971. godine), osetljivost ovih testova se povećala 100 puta ($2\log_{10}$) (21). Izračunato matematičkim modelima, rezidualni transmisivni rizik (verovatnoća da primalac bude zaražen i pored testiranja davalaca krvi na viruse transmisivnih bolesti) za HBV u SAD iznosi 1 : 63 000 jedinica krvi. Ponovljeno pozitivni davaoci se testiraju potvrdnim testom. U te svrhe se koristi test neutralizacije sa anti-HBs antitelima, gde nakon inkubacije dolazi do neutralizacije HBsAg. Kod stvarno pozitivnih uzoraka, HBsAg će biti neutralisan sa anti-HBs antitelom. Prisustvo HBV DNK koje se dokazuje NAT tehnologijom je pokazatelj tekuće infekcije i infektivnosti. Korišćenje ove tehnologije smanjuje period „prozora“ sa 59 dana (37–87 dana) testiranjem standardnim HBsAg testovima, na približno 40 dana korišćenjem MP NAT, do svega 3–4 nedelje korišćenjem ID NAT. U zemljama sa visokom prevalencom neophodno je korišćenje NAT tehnologije, a u zemljama sa niskom prevalencom to zavisi od „cost–benefit“-a (odnosa cene i koristi). U SAD je NAT tehnologijom utvrđen problem velikog broja lažno pozitivnih davalaca (oko 23%–75% anti-HBc lažno odbijenih davalaca) pa se poslednjih godina radi na iznalaženju odgovarajućeg algoritma za vraćanje ovih davalaca u raspoloživi pul (22–24).

HCV Ag i HCV RNK su prisutni na početku infekcije dok se anti-HCV antitela javljaju nekoliko nedelja nakon infekcije i najčešće ostaju trajno prisutna. Za rutinski skrining davalaca koriste se anti-HCV ELISA testovi, a kao potvrdni RIBA testovi. U poslednjim godinama 20 veka, uvedena su još dva testa za detekciju prisustva HCV: HCV Ag/At i HCV NAT. Period „prozora“ pre uvođenja NAT iznosio je oko 70 dana. Uvođenjem ID NAT ovaj period je skraćen na 15 dana, dok period „prozora“ za HCV Ag/At iznosi 40 dana. Pre uvođenja anti-HCV testova, postojao je značajan rizik od prenosa HCV-a transfuzijom krvi: 1% u SAD i 0,1% u Velikoj Britaniji (25). Sa implementacijom anti-HCV testova rizik je smanjen na 1 : 100 000 transfundovanih jedinica krvi. Sa uvođenjem NAT tehnologije rizik je smanjen na 0,03 – 0,5 : 1 000 000 (26, 27).

Zahvaljujući primeni najsavremenijih testova za skrining davalaca krvi (HIV Ag/At i NAT), smanjen je rizik od prenosa HIV-a putem transfuzije. Procenjuje se da on iznosi 1 : 2 – 5 000 000 u razvijenim zemljama. Brojni proizvođači konstruišu testove u kojima se koristi više od jednog metoda da bi se poboljšale performanse, naročito u ranoj detekciji novoinficiranih osoba. To su tzv. kombinovani testovi za istovremenu detekciju anti-HIV 1+2 antitela i p24 antigena. Oni poboljšavaju rano otkrivanje infekcije, sa 22 dana anti-HIV testovima, na 16 dana HIV Ag/At testovima. Pored toga, u zemljama gde je neophodno testiranje na p24 antigen, kombinovani testovi omogućavaju da se bez upotrebe posebnih testova, dodatnih troškova i angažovanja kadrovskih resursa obavi kompletno testiranje. U kombinovanim testovima se koriste isti principi kao u pojedinačnim testovima (28, 29).

Lančana reakcija polimeraze*Ekstrakcija*

Virusne čestice se prvo delimično koncentruju u uzorku plazme centrifugiranjem (rcf = 2574g, 30 minuta), a zatim sledi liza virusnih proteina uz pomoć litičkog reagensa. Unutrašnja ili interna kontrola se stavlja u svaki uzorak i služi kao kontrola ekstrakcije i amplifikacije za svaki pripremani uzorak i spoljne ili eksterne kontrole (pozitivna i negativna kontrola). Unutrašnja kontrola je DNK plazmid (cirkularni dvolančani DNK molekul u koji je ugrađena sekvenca slične dužine i sastava nukleotida kao kod dela virusnog genoma od interesa), koji sadrži identične prajmer-vezujuće regione kao virusni genom. Međutim, proba-vezujući region u molekulu plazmida je jedinstven i drugačiji od genoma virusa, što omogućava razlikovanje unutrašnje kontrole od genetskog materijala virusa. Na ovaj način osigurana je ekvivalentna amplifikacija DNK unutrašnje kontrole i željenog dela virusnog genoma (17, 30).

je prednost i to što se u testovima koristi hemijski stabilno jedinjenje (DNK) koje se u laboratoriji može sintetisati i umnožiti. Ovim metodom je moguće kvalitativno i kvantitativno pokazati prisustvo definisane sekvence nukleotida (gena) u vrlo maloj količini kliničkog uzorka i u kratkom vremenskom periodu. U dijagnostičkom testu kao DNK proba može se koristiti ceo gen ili pak samo karakteristični deo gena koji se može sastojati i od svega 20 nukleotida. Ranije su se za obeležavanje DNK proba koristili radioaktivni nukleotidi (metodom „nick” translacije ili obeležavanjem krajeva) i tražena sekvenca DNK se detektovala autoradiografijom. Danas je u širokoj upotrebi metoda obeležavanja proba „hladnim” obeleživačima. Hibridizovani molekuli se detektuju bojenim reakcijama, koje se po svojoj osetljivosti skoro izjednačuju sa radioaktivnim probama. Mogućnost da se u detekciji gena izbegne upotreba radioaktivnih jedinjenja umnogome je olakšala primenu tehnika genetskog inženjeringa u transfuziološkim laboratorijama. To je izuzetno značajno, naročito za detekciju infektivnog agensa, gde je često potrebna brza i pouzdana dijagnostika (17, 30, 31).

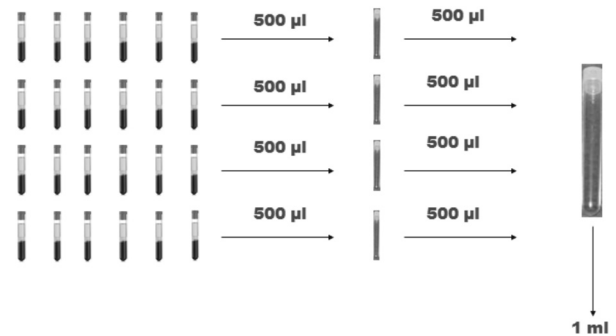
Detekcija

Posle amplifikacije PCR-om, dodatkom denaturacionog rastvora, hemijski se denurišu ampikoni dobijeni sa virusnog genoma i unutrašnje kontrole i formiraju jednolančanu DNK. Zatim se dodaje rastvor magnetnih čestica, za koje su vezane oligonukleotidne probe obeležene biotinom. Nukleotidne sekvence proba su komplementarne amplifikovanom segmentu genoma virusa i amplifikovanom segmentu unutrašnje kontrole. Posle hibridizacije, ispiraju se magnetne čestice, da bi se uklonio nevezani materijal i onda se dodaje konjugat (enzim avidin peroksidaza izolovana iz konjske repice). Konjugat se vezuje za hibridizovani genetski materijal obeležen biotinom. Još jednim ispiranjem se uklanja nevezani konjugat i onda se dodaje rastvor supstrata koji sadrži vodonik peroksid i 3, 3', 5, 5' – tetrametil benzidin (TMB). U prisustvu vodonik peroksida, za čestice vezana peroksidaza katalizuje oksidaciju TMB, koji formira obojeni kompleks. Apsorbenca se meri kolorimetrijski (32–34).

Rezultati NAT testiranja na VMA

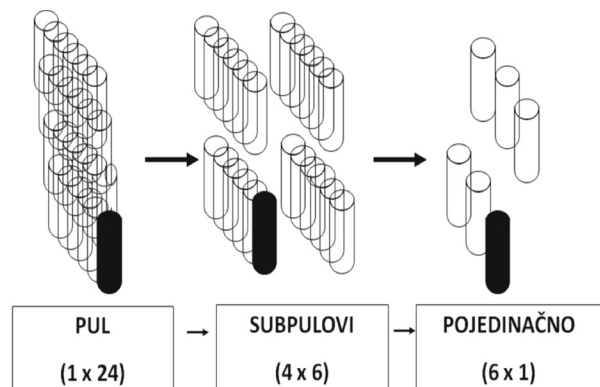
U Institutu za transfuziologiju VMA, NAT tehnologija se koristi od aprila 2007. godine. Svi davaoci krvi se prvo testiraju na automatizovanim aparatima standardnim skrining ELISA testovima na HBsAg, anti-HCV i HIV Ag/At (anti-HIV) (Tabela 2). Zatim se svi preliminarno negativni davaoci testiraju MP NAT-om u pulovima od 24 uzorka. Kada se testiranje obavlja u pulovima od 24, pulovi se

formiraju na način prikazan na Slici 3. Preliminarno ELISA pozitivni uzorci se testiraju ID NAT, a na ovaj način sprečava se potencijalna kontaminacija pula, a samim tim i veći utrošak reagenasa i vremena za konačno utvrđivanje pozitivnog uzorka u pulu od 24. Pored toga ove uzorke smo testirali i potvrdnim testovima prikazanim u Tabeli 3.



Slika 3. Šematski prikaz metode puliranja uzoraka plazme u našem institutu

Uzorke i reagense smo pripremali u namenskom aparatu DNA/RNA UV-CLEANER UVC/T-M-AR (Biosan, Litvanija). Pripremanje pulova od 24 uzorka započinje tako što se iz 6 epruveta sa uzorkom krvi davalaca (epruvete od 7 mL sa K₂EDTA, Terumo, Japan) uzima po 500 µL plazme i ukapava u posebnu epruvetu za puliranje. Na ovaj način dobijamo 3 mL subpula koji u sebi sadrži plazmu od 6 davalaca. Zatim iz 4 subpula uzimamo po 500 µL plazme i dobijamo 2 mL pula koji u sebi sadrži uzorke od 24 davaoca (4 x 6) (Slika 3). U slučaju da je neki uzorak u pulu pozitivan, primenjuje se algoritam sa Slike 4, za detekciju tog uzorka. Postupak centrifugiranja i pripreme pulova traje 2–3 sata u zavisnosti od broja uzoraka.



Slika 4. Algoritam utvrđivanja pozitivnog uzorka u pulu od 24 (Roche Diagnostics)

U našem radu NAT HBV/HCV/HIV testiranje obavljeno je pomoću sistema aparata i reagenasa proizvođača Roche Diagnostics (Nemačka) specifično prilagođenog za upotrebu u transfuziološkim jedinicama. Proces započinje tako što se u ulazne epruvete za aparat COBAS Ampliprep (Roche Diagnostics, Nemačka) ukapava po 1 mL iz pula (1 pul – 1 ulazna epruveta). Što se tiče pojedinačnog testiranja postupak je mnogo jednostavniji: ukapa se 1 mL plazme iz epruvete sa krvlju preliminarno pozitivnog davaoca u ulaznu epruvetu. Ulazne epruvete se postavljaju u aparat COBAS Ampliprep u kome se vrši automatizovana ekstrakcija (izdvajanje) genetskog materijala virusa (DNK ili RNK). Nakon procesa ekstrakcije dobijeni genetski materijal virusa se nalazi u izlaznim epruvetama u zapremini od 75 µL elucionog pufera. Izdvajanje genetskog materijala traje 1,5–2 sata u zavisnosti od broja uzoraka.

U izlazne epruvete se dodaje 125 µL MP (MultiPrep) diluenta i na taj način se dobija 200 µL za PCR umnožavanje i detekciju virusnih genoma na aparatu COBAS Amplicor (Roche Diagnostics, Nemačka). Za svaki test (HBV DNK, HCV RNK, HIV RNK) uzima se po 50 µL izolata iz izlazne epruvete i 50 µL odgovarajućeg amplifikacionog tzv. Master Mix-a koji se ukapavaju u cirkularno povezane epruvete A-prstena (eng. Amplification Ring). A-prstenovi se postavljaju u amplifikacioni deo aparata COBAS Amplicor. U ovom aparatu reversna transkripcija, PCR i detekcija izolovanog virusnog genoma i unutrašnje kontrole traje 6–7 sati i vrši se automatski kontrolisano sa adekvatnim kompjuterskim programom (Amplilink 2.41, Roche Diagnostics, Nemačka). Zajedno sa pripremom pulova, NAT procedura testiranja traje oko 10–12 sati. Važno je istaći da je transfuziološki PCR (NAT) kvalitativan test koji je senzitivniji od svih do sada konstruisanih kvantitativnih PCR testova za HBV, HCV i HIV. Po datim karakteristikama proizvođača donja granica osetljivosti za HBV ID NAT iznosi 4.41 IU/mL (22 kopije/mL), a za mini-pul od 24 uzorka 120 IU/mL; za HCV ID NAT 28.8 IU/mL (78 kopija/mL), odnosno 504 IU/mL

za HCV MP NAT; za HIV ID NAT 61.25 IU/mL (39.2 kopija/mL) tj. 1882 IU/mL za HIV MP NAT (32–34).

U transfuziološkim centrima širom sveta uglavnom se koriste aparati i testovi dva proizvođača: Roche Diagnostics i Chiron GenProbe. Kada je u pitanju senzitivnost i specifičnost njihovih testova nema statistički značajnih razlika kada se paralelno testiraju u istom formatu (ID *versus* ID, ili MP *versus* MP). Do statistički značajnih razlika može doći kada se porede različiti formati (ID *versus* MP) (44–46).

U Institutu za transfuziologiju VMA, od aprila 2007. godine do juna 2011. godine, NAT tehnologijom ispitano je 50.369 davalaca u pulovima od 24 uzorka. Od ovog broja pojedinačno je testirano 2.689 davalaca. Pozitvni rezultati u MP testiranju bilo je ukupno 3, a u ID testiranju bilo je ukupno 250 (Tabela 1).

Tabela 1. Rezultati ispitivanja davalaca krvi primenom NAT

| VRSTA TESTIRANJA | BROJ TESTIRANIH UZORAKA | | BROJ POZITIVNIH UZORAKA | |
|---------------------|----------------------------|-------|----------------------------|-----|
| | MP | ID | MP | ID |
| HBV DNK | 50 369 | 854 | 1 | 135 |
| HCV RNK | 50 369 | 944 | 2 | 108 |
| HIV RNK | 50 369 | 891 | – | 7 |
| UKUPNO | 151 107 | 2 689 | 3 | 250 |

Paralelno je vršeno testiranje istih davalaca ELISA i potvrdnim testovima za HBV, HCV i HIV (Tabela 2 i Tabela 3). Od ukupnog broja testiranih uzoraka, jedan uzorak je bio proglašen HBsAg negativnim (kao posledica ljudske greške), ali je prilikom NAT testiranja utvrđeno da je pozitivan, i sprečeno je prenošenje ovog virusa bolesnicima. Takođe, dva uzorka krvi davalaca su bila anti-HCV nereaktivna na ELISA testiranju, a NAT pozitivna. Četiri davaoca su bili HBsAg pozitivni na ELISA testiranju, a NAT pojedinačno negativni. Dvanaest uzoraka su bili anti-HCV, preliminarno i potvrdno pozitivni, a NAT negativni. Kod HIV-a nije bilo diskrepanci, svi HIV potvrdno pozitivni su bili i NAT pozitivni.

Tabela 2. Vrste skrining testova

| PROIZVOĐAČ | ELISA test | | |
|------------------|---|--------------------------|---------------------------|
| | HBsAg | Anti-HCV | HIV Ag/At (anti-HIV) |
| Abbott, SAD | Architect HBsAg Qualitative, HBsAg Quantitative | Architect HCV | Architect Combo Ag/Ab |
| Ortho, SAD | Vitros HBsAg | Vitros HCV, HCV 3.0 Save | Vitros anti-HIV 1/2 |
| Behring, Nemačka | Enzygnost HBsAg | | Enzygnost HIV Integral II |
| Biokit, Španija | Bioelisa HBsAg | Bioelisa HCV 4.0 | Bioelisa HIV 1+2 Ag/Ab |
| Biorad, SAD | | Monolisa HCV | HIV Combo Ag/Ab |

Tabela 3. Vrste potvrđnih testova

| PROIZVOĐAČ | POTVRĐNI TEST | | |
|------------------------------|--------------------------------------|---------------------|--|
| | Neutralizacija Anti-HBsAt | RIBA HCV-3 | HIV Western blot, p24 test neutralizacije |
| Abbott, SAD | HBsAg Confirmatory | | |
| Ortho, SAD | HBsAg Confirmatory | | |
| Behring, Nemačka | HBsAg Confirmatory | | |
| Innogenetics, Belgija | | Inno-Lia HCV Score | Inno-Lia HIV I/II Score Innotest HIV Ag mab Innotest HIV Antigen mab |
| MP Diagnostics, SAD | | Bioblot HCV | HIV Blot 2.2 Bioblot HIV-1 Plus |
| Novartis, SAD | | Chiron RIBA HCV 3.0 | |

Diskusija

Praktična primena PCR tehnologije počinje već 1985. godine: u transfuziologiji za pretransfuzijsko testiranje jedinica krvi na transmisivne bolesti, za genotipizaciju antigena HLA i antigena krvno-grupnih sistema i za otkrivanje i kliničku dijagnozu genetskih bolesti (17).

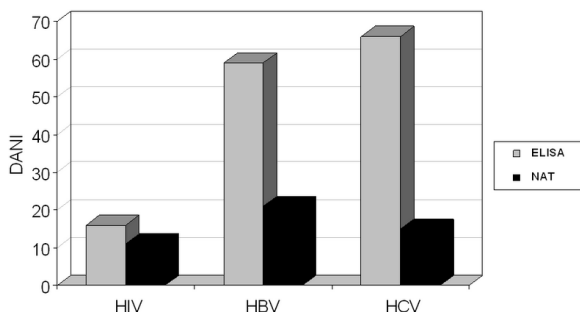
Krajem 90-ih godina prošlog veka prelazi se na rutinsko korišćenje PCR-a u detekciji HCV RNK, HIV RNK, a nešto kasnije i HBV DNK, kako u transfuziološkim jedinicama tako i u dijagnostičkim kliničkim centrima. U Japanu se već od 1999. godine testiraju sve jedinice krvi na HCV RNK, HIV RNK, kao i na HBV DNK, zbog visoke prevalencije virusa HBV u ovoj populaciji (12). Iste godine u SAD je uvedeno obavezno testiranje jedinica krvi na HCV RNK i HIV RNK. Međutim, FDA je donela zaključak da je neopravdana primena testa za HBV DNK u rutinskom testiranju. Uvođenje HBV DNK je još diskutabilno u mnogim zemljama, i povezano je sa epidemiološkom situacijom i trenutnom strategijom za serološki skrining (11, 35, 36). U tom smislu bi trebalo istaći veliki značaj NAT-a u slučajevima okultne HBV infekcije (OBI) koja se definiše kao HBV DNK pozitivna a HBsAg negativna infekcija. Okultna HBV infekcija može predstavljati akutnu infekciju u periodu „prozora“, hroničnu infekciju, prisustvo replikacije virusa na niskom nivou ili prisustvo mutančnih oblika virusa (37). U pet evropskih zemalja upotrebom mini-pula ili individualnih NAT testova utvrđena prevalenca OBI bila je od 1 : 7 500 u Sloveniji do 1 : 63 000 u Poljskoj. U Japanu je pojava OBI znatno ređa i iznosi 1 : 107 000. Produženim testiranjem je pokazano da se OBI u „prozor“ periodu pojavio kod 5 od 31 detektovanog slučaja (16%) u Poljskoj, a u Japanu u 40%

slučajeva (37). Navedeni rezultati pokazuju da bi odluka o neophodnosti rutinskog testiranja HBV DNK u transfuziološkim jedinicama trebalo da bude donesena nakon analize svih relevantnih epidemioloških podataka u zemlji korelisanih sa finansijskim opravdanjem.

Busch i saradnici iz američkog Crvenog krsta, su utvrdili da čak do 20% anti-HCV reaktivnih davalaca, može biti NAT negativno (38, 39). U našem radu mi smo detektovali 12 takvih slučajeva. Postoje izveštaji o infektivnosti anti-HCV ili HCV NAT negativnih, krvnih produkata (40). Jasno je da su takvi slučajevi izuzeci, ali to znači da čak i negativan nalaz HCV NAT-a kod davalaca, ne znači da primalac neće biti inficiran HCV-om. HCV NAT se primenjuje u rutinskom skriningu davalaca od 1999. godine u Japanu, Nemačkoj, SAD, kao i u većini zemalja Zapadne Evrope (41–43).

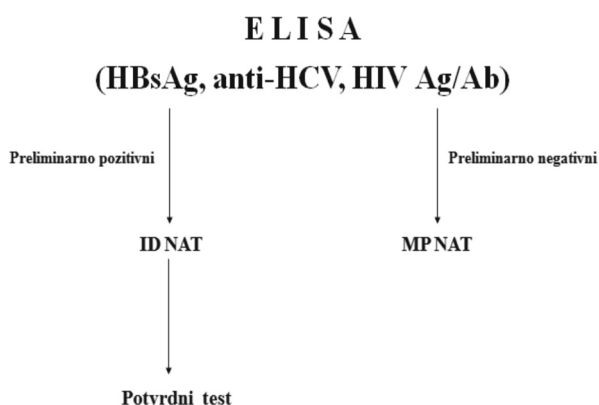
U našem ispitanom uzorku nije dokazana korist NAT na osnovu detekcije virusa u periodu „ELISA prozora“ kada još ne postoje markeri za enzimoimunsko dokazivanje. Kleinman i saradnici su u svojoj studiji pokazali na broju od 581.790 donacija, da je broj jedinica krvi kod koji je HBV u periodu „prozora“ 1 : 352 451 (35). Stramer sa saradnicima je testirala 37.164.054 jedinica krvi. Od tog broja 12 su bile pozitivne na HIV-1 RNK, a ELISA negativne (1 : 3,1 miliona donacija). Na HCV je testirano 39.721.404 jedinica. Sto sedamdeset su bile pozitivne na HCV RNK ili 1 : 230 000 donacija (ili 1 : 270 000 ako se uzmu u obzir još 139 uzoraka koji su bili pozitivni kada su testirani osetljivijim anti-HCV testovima). Njihov zaključak je da je primena NAT HIV i NAT HCV u SAD spečava godišnje 5 odnosno 56 infekcija ovim virusima (29).

Skraćenje perioda „prozora” upotrebom NAT tehnologije je značajno, što se vidi na Slici 5. Sumiranjem rezultata iz više izvora dobijeno je da je period „prozora” skraćen: za HIV sa 16 na 9 do 11 dana, za HBV sa 59 na 21 dan, a za HCV sa 66 na 12 do 15 dana (23, 27, 28).



Slika 5. Skraćenje perioda „prozora” upotrebom NAT u odnosu na upotrebu ELISA (Roche Diagnostics.)

U našem institutu testiranje uzoraka na prisustvo virusa HIV, HBV i HCV vrši se po planu datom na Slici 6. Algoritam koji smo usvojili je modifikovani algoritam Kleinmana i saradnika (47). U slučaju NAT testova osnovni problem je bio sastaviti protokol na osnovu koga bi se donosila odluka o upotrebi MP ili ID. Naime, testiranje u pulovima ima nižu cenu, ali je povezano sa većim brojem lažno negativnih rezultata. S druge strane, vreme potrebno za identifikaciju infektivnog davaoca kod MP testova je produženo (do utvrđivanja pozitivnog uzorka u pulu od 24, može proći od 48 do 72 sata), što može dovesti do isteka roka upotrebljivosti trombocita. Pojedinačno testiranje je skuplje, ali je osetljivije i specifičnije. S obzirom da se u našem institutu obrađuje manji broj uzoraka u odnosu na velike transfuziološke svetske centre, bilo je opravdano da sve preliminarno ELISA negativne uzorke analiziramo sa MP NAT, a ELISA preliminarno pozitivne analiziramo sa ID NAT.



Slika 6. Algoritam testiranja davalaca krvi u našem institutu

Zaključak

Osnovne prednosti NAT tehnologije u pretransfuzijskom testiranju jedinica krvi su u: povećanju senzitivnosti i specifičnosti testiranja, skraćenju perioda „prozora” i rezidualnog transmisivnog rizika. Petogodišnji rezultati Instituta za transfuziologiju VMA potvrđuju opravdanost primene NAT, posebno prilikom korišćenja manje specifičnih/senzitivnih ELISA testova. Neusaglašenost je dobijena u poređenju rezultata NAT i enzimimunogenih testova kod detekcije HCV i HBV dok su kod HIV testova svi uzorci imali usaglašen rezultat. Kontinuirano sumiranje i određivanje korelacije rezultata različitih metoda i pristupa u detekciji virusa u krvi i krvnim proizvodima osnovni je korak u prevenciji transmisije infekcija, što je cilj našeg dosadašnjeg i budućeg rada.

Rad je urađen u okviru projekta: VMA/09-10/B.3

Summary

PRINCIPLES OF NAT TECHNOLOGY IN VIEW OF THE RESULTS OBTAINED AT THE INSTITUTE OF TRANSFUSIOLOGY OF MMA FROM 2007 TILL 2011

Nucleic-acid Amplification Testing (NAT) consist of extraction, amplification, hybridization and detection. Polymerase Chain Reaction (PCR) is method for amplification of viral genetic material (DNA/RNA) in enough number of copies, so we can detect them. Since year 1943, when transmission of hepatitis via transfusion was reported till beginning of 21st century, when NAT was implemented, large number of tests for detection of hepatitis B and C virus (HBV, HCV) and human immunodeficiency virus (HIV) were developed. In this article, we describe basic principles of detection of these viruses by NAT. We also show results from testing samples of blood donors in Institute of Transfusiology from April 2007 till June 2011. From 50 369 donors testing in Mini Pools (MP) of 24, we found two HCV RNA positive samples, one HBV DNA positive sample and all pools were HIV RNA negative. From 2 689 samples which were testing by Individual Donation (ID) NAT, 135 were HBV DNA positive, 108 were HCV RNA positive and 7 were HIV RNA positive. All samples also were tested by Enzyme Link Immunosorbent Assay (ELISA) and Confirmatory tests. Comparison of our results show validity of NAT testing, especially when ELISA tests of less specificity and sensitivity were used. Key words: NAT, PCR, HBV, HCV, HIV

Literatura

1. Beeson PB. Jaundice occurring one to four months after transfusion of blood or plasma: report of seven cases. JAMA 1943; 121: 1332-4.
2. Morgan HW, Williamson DA. Jaundice following administration of human blood products. BMJ 1943; 1: 750-3.
3. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A 'new' antigen in leukemia sera. JAMA 1965; 191: 541-6.
4. Zarski JP, Ganem D, Wright TL. Hepatitis B virus. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, editors. Clinical Virology. Washington, DC: ASM Press; 2002. p. 623-57.
5. Andre F. Hepatitis B epidemiology in Asia, the Middle East, and Africa. Vaccine 2000; 18: S20-S22.
6. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science 1989; 244: 359-62.

7. Quer, J, Mur, JIE. Hepatitis C virus: epidemiology. In: Thomas HC, Lemon S, Zuckerman AJ, editors. *Viral Hepatitis*. Malden, MA: Blackwell; 2005. p. 407–25.
8. Dow BC, Fiebig EW, Busch MP, Retroviruses. In: Barbara JAJ, Regan FAM, Contreras MC, editors. *Transfusion Microbiology*. Cambridge University Press; 2008. p. 59.
9. Anonymous. Detection of West Nile virus in blood donations – United States. *MMWR* 2003; 52: 769–72.
10. Petersen LR, Busch MP. Transfusion – transmitted arboviruses. *Vox Sanguinis* 2010; 98: 495–503.
11. Koppelman HGMM. , Assal A, Chudi M, et al. Multicenter performance evaluation of a transcription– mediated amplification assay for screening of human immunodeficiency virus– 1 RNA, hepatitis C virus RNA and hepatitis B virus DNA in blood donations. *Transfusion* 2005; 45: 1258–66.
12. Yugi H, Hino S, Satake M, Tadodoro K. Implementation of donor screening for infectious agents transmitted by blood by nucleic acid technology in Japan. *Vox Sanguinis* 2005; 89: 265.
13. O' Riordan J, Williams P, Dounell J. HCV and HIV– 1 donor skirting using nucleic acid amplification technique (NAT). *Vox Sanguinis* 2005; 89: 266.
14. Laperche S, Elghouzzi HM, Morel P, Asso–Bonnet M, Le Marrec N, Giraultet A, et al. Is an assay for simultaneous detection of hepatitis C virus core antigen and antibody a valuable alternative to nucleic acid testing?. *Transfusion* 2005; 45: 1965–72.
15. Delwart LE, Kalmin DN, Jones ST, Ladd DJ, Foley B, Tobler LH, et al. First report of human immunodeficiency virus transmission via an RNA–screened blood donation. *Vox Sanguinis* 2004; 86: 171–7.
16. Trkuljić M., Borovčanin N., Vučetić D., Jovičić D. Transmisivne bolesti–etiopatogeneza, testiranje na markere, inaktivacija patogena. In: Balint B, Trkuljić M, Todorović M, editors. *Osnovni principi hemoterapije*. Beograd: Čigoja štampa; 2010. p. 421–505.
17. Magić Z., Balint B. Osnovi molekulske medicine. In: Balint B, editor. *Transfuziologija*. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 2004. p. 685–701.
18. Dreier J, Störmer M, Kleesiek K. Real–time polymerase chain reaction in transfusion medicine: applications for detection of bacterial contamination in blood products. *Transfus Med Rev*. 2007; 21;3: 237–54.
19. Vučetić D., Taseski J., Vasiljević N. Alanine aminotransferase as a surrogate test for screening blood donors. Vth Regional European Congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT, European section). Oct 1–4, 1997; Frankfurt. *Infusionstherapie Transfusionsmedizin* 1997; 24: 212.
20. Biswas R, Tabor E, Hsia CC, Wright DJ, Laycock ME, Fiebig EW, et al. Comparative sensitivity of HBV nucleic acid tests and HBsAg assays for detection of acute HBV infections. *Transfusion* 2003; 43: 788–98.
21. Stramer S, Brodsky J, Preston S, Kuhns MC, Pierce MP, and Smithet RI. Comparative sensitivities of HBsAg and HBV NAT. *Transfusion* 2001; 41(Suppl.): 8S (abstract).
22. Stramer S, Brodsky J, Preston S, Kuhns MC, Pierce MP, and Smithet RI. Comparative sensitivities of HBsAg and HBV NAT. *Transfusion* 2001; 41(Suppl.): 8S (abstract). Stramer SL. Pooled HBV DNA testing by nucleic acid amplification: implementation or not. *Transfusion* 2005; 45: 1242–6.
23. Stramer SL. Pooled HBV DNA testing by nucleic acid amplification: implementation or not. *Transfusion* 2005; 45: 1242–6.
24. Vasiljević N. Transfuzijski transmisivne bolesti. In: Balint B, editor. *Transfuziologija*. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 2004. p. 665–84.
25. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001; 345: 41–52.
26. Brojer E, Grohowska A, Medynska J, Grabarczyk P, Mikulska M, Letowska M, et al. The hepatitis C virus genotype and subtype frequency in hepatitis C virus RNA– positive, hepatitis C virus antibody–negative blood donors identified in the nucleic acid test screening program in Poland. *Transfusion* 2004; 44: 1706–10.
27. Alvarez M, Planelles D, Vila E, Montoro J, and Franco E. Prolonged hepatitis C virus seroconversion in a blood donor, detected by HCV Antigen test in parallel with HCV RNA. *Vox Sanguinis* 2004; 86: 266–7.
28. Palla P, Vatteroni ML, Vacri L. HIV–1 NAT minipool during the pre–seroconversion window period: detection of repeat blood donor. *Vox Sanguinis* 2006; 90: 59–62.
29. Stramer SL, Glynn SA, Kleinman SH, Strong DM, Caglioti S, Wright DJ, et al. Detection of HIV–1 and HCV infections among antibody–negative blood donors by nucleic acid amplification testing. *N Eng J Med* 2004; 351: 760–8.
30. Ridgwell K. Genetics tools: PCR and Sequencing. *Vox Sanguinis* 2004; 87 (suppl. 1): 6–12.
31. Erlich AH. PCR Technology. In: Meyers R. A. ed. *Molecular biology and biotechnology a comprehensive desk reference*. VCH, New York; 1995. p. 641–8.
32. Roche Molecular Systems, Inc. COBAS AmpliScreen HBV Test. Copyright 2005: 1– 20.
33. Roche Molecular Systems, Inc. COBAS AmpliScreen HCV Test, version 2.0. Copyright 2005: 1– 18.
34. Roche Molecular Systems, Inc. COBAS AmpliScreen HIV– 1 Test, version 1.5. Copyright 2005: 1– 18.
35. Kleinman SH, Strong DM, Tegtmeyer GG, Holland PV, Gorlin JB, Cousins C, et al. Hepatitis B virus (HBV) DNA skirting of blood donations in mini–pools with the COBAS AmpliScreen HBV test. *Transfusion* 2005; 45: 1247–57.
36. Marshall DA, Kleinman SH, Wong JB. Cost– effectiveness of nucleic acid test screening of volunteer blood donations for hepatitis B, hepatitis C and human immunodeficiency virus in the United States. *Vox Sanguinis* 2004; 86: 28–40.
37. Reesink HW, Engelfriet CP, Henn G, Mayr WR, Delage G, Bernier F. Occult hepatitis B infection in blood donors. *Vox Sanguinis* 2008; 94: 153–66.
38. Busch M, Glynn S, Stramer S, Orland J, Murphy E, Wright D, et al. Correlates of hepatitis C virus (HCV) RNA negativity among HCV–seropositive blood donors. *Transfusion* 2006; 46: 469–75.
39. Busch MP, Glynn SA, Stramer SL, Strong DM, Caglioti S, Wright DJ, et al. A new strategy for estimating risks of transfusion–transmitted viral infections based on rates of detection of recently infected donors. *Transfusion* 2005; 45: 254–64.
40. Schüttler GC, Caspari G, Jursch AC, Willems WR, Gerlich WHP, Schaefer S. Hepatitis C virus transmission by a blood donation negative in nucleic acid amplification test for viral RNA. *The Lancet* 2000; 355: 41–2.
41. International Task Force on Nucleic Acid Amplification Testing of Blood Donors. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion transmitted infectious diseases. *Transfusion* 2000; 40: 143–59.
42. Laperche S, Ronger P, Smilovici W, Hervé P, Lefrère JJ. Alternatives to nucleic acid testing in the blood transfusion service. *The Lancet* 2002; 360:1519.
43. Palomäki P, Wessberg S, Tuomi K, Laitinen H. Screening of blood donors for hepatitis C virus RNA with the MagNA Pure– COBAS AmpliScreen metod. *Tranfusion* 2005; 45: 1518–22.
44. Koppelman MH, Sjerps MC, Reesink HW, Cuypers HT. Evaluation of COBAS AmpliPrep nucleic acid extraction in conjunction with COBAS AmpliScreen HBV DNA, HCV RNA and HIV–1 RNA amplification and detection. *Vox Sanguinis* 2005; 89: 193–200.
45. Katsoulidou A, Moschidis Z, Sypsa V, Chini M, Papatheodoridis GV, Tassopoulos NC, et al. Analytical and clinical sensitivity of the Procleix Ultrio HIV–1/HCV/HBV assay in samples with a low viral load. *Vox Sanguinis* 2007; 92: 8–14.
46. Assal A, Barlet V, Deschaseaux M, Dupont I, Gallian P, Guitton C, et al. Comparison of the analytical and operational performance of two viral nucleic acid test blood screening systems: Procleix Tigris and cobas 201. *Transfusion* 2009; 49(2): 289–300.
47. Kleinman SH, Stramer SL, Brodsky JP, Caglioti S, Busch MP. Integration of nucleic acid amplification test results into hepatitis C virus supplemental serologic testing algorithms: implications for donor counseling and revision of existing algorithms. *Transfusion* 2006; 46: 695–702.