

Zvýšenie bezpečnosti transfúzných liekov testovaním nukleových kyselín u darcov krvi



Ing Martina Melušová, PhD
RNDr. Petra Maňková
Mgr. Rozvita Štiglinc

RNDr. Kristína Fejdiová
SC Bratislava

Bezpečnosť krvi

Jeden z hlavných cieľov NTS SR

Bezpečnosť krvi – krvou prenosné infekčné ochorenia

- Jedným z hlavných cieľov NTS SR je zabezpečiť, aby krv a jej zložky bez ohľadu na ich plánované využitie, vykazovali v rámci krvného transfúzneho reťazca porovnateľnú kvalitu a bezpečnosť, pričom prioritou pri odbere, spracovaní, distribúcii a využití krvi a krvných zložiek je ochrana zdravia verejnosti a účinná prevencia prenosu infekčných chorôb.
- Samotná krv však predstavuje potenciálne riziko.
- Sú ním krvou prenosné infekčné ochorenia:

infekcie vo fáze diagnostického okna:

- vírus ľudskej imunodeficiencie typu 1 (HIV-1) a 2 (HIV-2)
- vírus hepatitídy C (HCV)
- vírus hepatitídy B (HBV)

infekcie na ktoré darcovia bežne testovaní nie sú:

- vírus hepatitídy typu E (HEV)
- vírus západonílskej horúčky (WNV)
- vírus hepatitídy A (HAV)

Bezpečnosť krvi – povinné testovanie infekčných markerov

- **HBV, HCV, HIV** – významné krvou prenosné infekčné ochorenia, povinnosť testovať vyplýva z platných legislatívnych noriem SK / EÚ.
- V súčasnosti je detekcia krvou prenosných vírusových infekcií HIV, HCV, HBV u darcov krvi založená prevažne len na sérologickom skríningu protilátok a antigénov:

HIV

anti-HIV, HIV p24

HCV

anti-HCV

HBV

HBsAg, anti-HBc

- ktoré však nie je možné zachytiť v primárnej fáze infekcie.
- Medzi darcami krvi bola pozorovaná vysoká miera expozície **HEV** a boli hlásené prípady prenosu spojené s transfúziou.
- Bol potvrdený prenos **WNV** transfúziou krvi, transplantáciou tkanív, transplacentárne, kojením.
- Rovnako riziko prenosu transfúziou predstavuje aj **HAV**.

Bezpečnosť krvi – epidemiologická situácia

- HEV
- Prevažne sa jedná o fekálno-orálny prenos
- Často prebieha bez príznakov
- V prípade manifestácie sa v akútnej fáze podobá HAV, ale priebeh je ťažší s výraznejším poškodením pečene.
- Na SK podozrenie na HEV u viac ako 1000 pacientov (2012 – 2017)
- V r. 2020 bolo na SK zaznamenaných 55 potvrdených prípadov akútnej HEV
- Potvrdený prenos transfúziou (FR 22 prípadov za posledné roky)
 - zavedenie testovania HEV RNA zo špecifických bezpečnostných dôvodov
 - ochrana imunokompromitovaných pacientov
 - identifikácia bezpríznakových darcov
 - zaistenie maximálnej bezpečnosti transfúzných liekov...

Bezpečnosť krvi – epidemiologická situácia

- **WNV**
- Prvý autochtónny prípad ochorenia vyvolaného WNV u človeka v Slovenskej republike bol laboratórne potvrdený v septembri 2019
- Ďalší prípad v júli 2022 a v r 2024
- Výskyt vektora na Slovensku bol navyše potvrdený aj v roku 2025.
- V rámci plánu pripravenosti pre prípad endémie WNV, zaviedla NTS SR už v roku 2019 testovanie WNV RNA ako formu prevencie prenosu WNV transfúznymi liekmi a to v období august–november, nakoľko toto obdobie je hlavnou sezónou aktivity komárov; v oblastiach s potvrdeným autochtónnym prenosom (juhozápad SR).
- V súčasnosti je bezpečnosť transfúzných liekov v súvislosti s výskytom vírusu západonílskej horúčky zaistená kombináciou testovania darcov a dočasného vyradenia rizikových osôb.

Bezpečnosť krvi – epidemiologická situácia

- **HAV**
- NTS SR komunikuje s Úradom verejného zdravotníctva SR a regionálnymi úradmi verejného zdravotníctva.
- Bezpečnosť transfúzných liekov v súvislosti s výskytom vírusu hepatitídy A (HAV) je založená primárne na dôslednom výbere darcov a anamnestickom dotazníku, keďže rutinné laboratórne testovanie na tento typ žltacky sa (na rozdiel od typov B a C) štandardne nevykonáva.
- V prípade nedávnej nepriaznivej epidemiologickej situácie v SR, s výskytom lokálnych ohnisk vírusovej hepatitídy A a z dôvodu zvýšenia bezpečnosti transfúzných liekov NTS SR zaviedla testovanie HAV RNA u DK zo zasiahnutých oblastí.

Bezpečnosť krvi – skrátenie diagnostického okna

- Hlavný dôvod testovania NK v NTS SR – zachytiť infekcie
HBV, HCV, HIV vo fáze sérologického diagnostického okna
HEV, WNV, HAV podľa aktuálnej epidemiologickej situácie
- a tým výrazne zvýšiť bezpečnosť transfúzných liekov

• HBV DNA	16 dní	HBsAg	38,6 dňa
• HCV RNA	2,2 dňa	anti-HCV	58 dní
• HIV1,2 RNA	4,5 dňa	p24 HIV 1,2	15,5 dňa
• HEV RNA	2 týždne	HEV IgM	4 týždne
• WNV RNA	3–5 dní	sérológia WNV	sa bežne nevykonáva
• HAV RNA	1–2 týždne od expozície	HAV IgM	5–10 dní pred nástupom prvých klinických príznakov, pretrváva 4–6 mesiacov po infekcii

Bezpečnosť krvi – testovanie nukleových kyselín

- NTS SR zaviedla testovanie nukleových kyselín u všetkých darcov krvi a zložiek z krvi z individuálnych vzoriek krvi:

2019	HBV DNA, HCV RNA, HIV RNA
2019, 2022	WNV RNA
2023	HEV RNA
od 2024	WNV RNA počas obdobia s najväčším rizikom prenosu
2025/2026	HAV RNA

- HBV DNA, HCV RNA, HIV RNA, HEV RNA – diagnostická súprava Procleix Ultrio Plex E
- WNV RNA – diagnostická súprava Procleix WNV RNA
- HAV RNA – diagnostická súprava Procleix Parvo/HAV
- na plnoautomatickom analyzátore Procleix Panther System od firmy Grifols.

testovanie Nukleových Kyselín

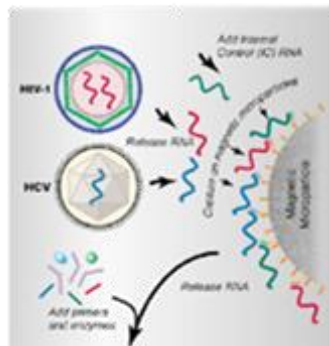
Metóda TMA

Záchyt cieľa

TCR TER

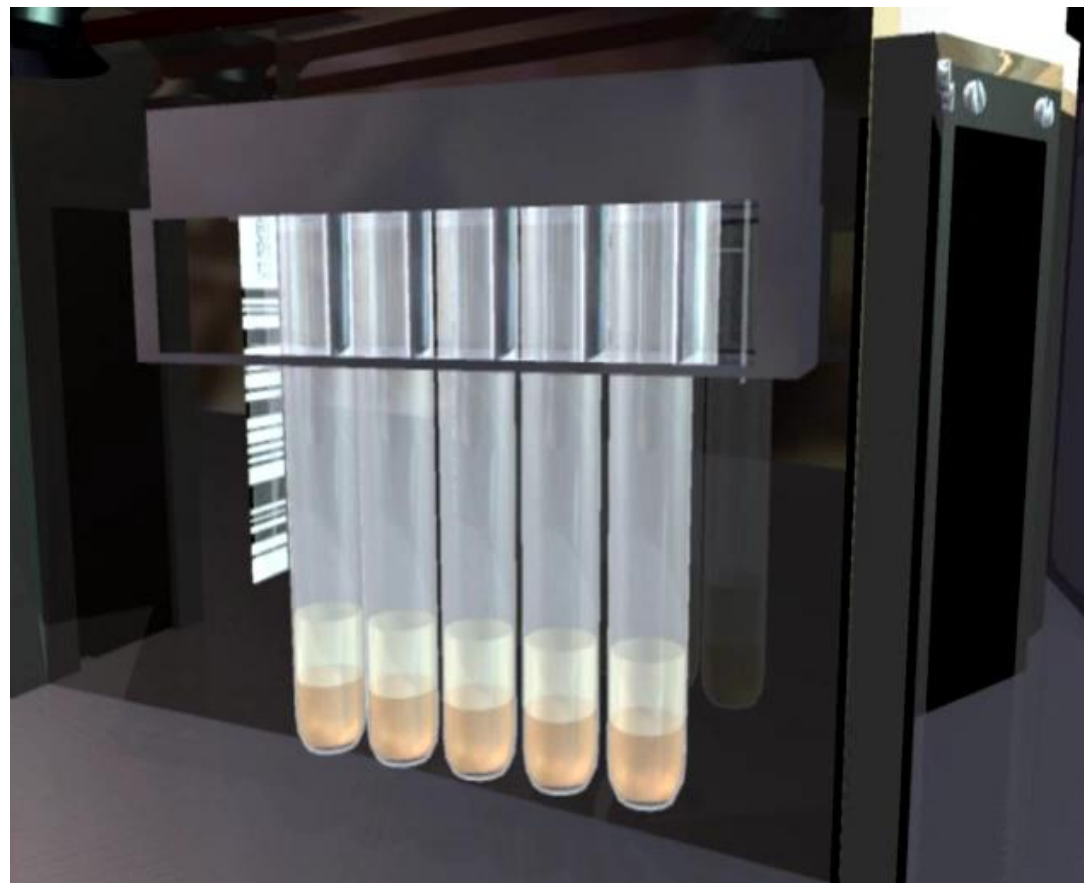


HIV-1
HBV
HCV
HEV
IC



IC

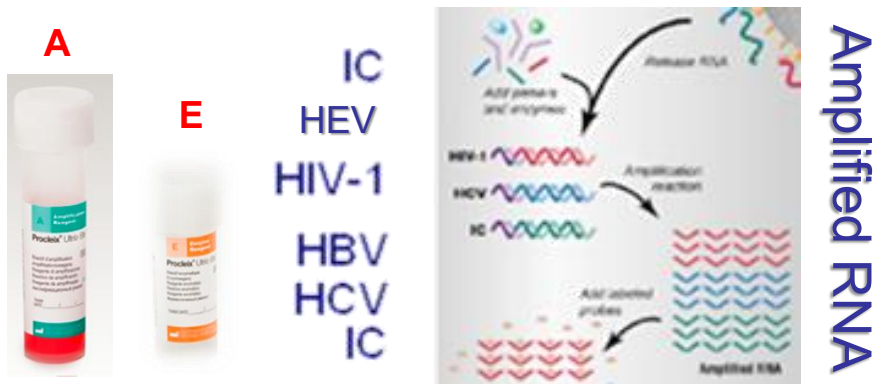
- Target **C**apture **R**eagent 2-8°C
- Internal **C**ontrol -15 -35°C
- **w**TCR 32°C / 2-8°C



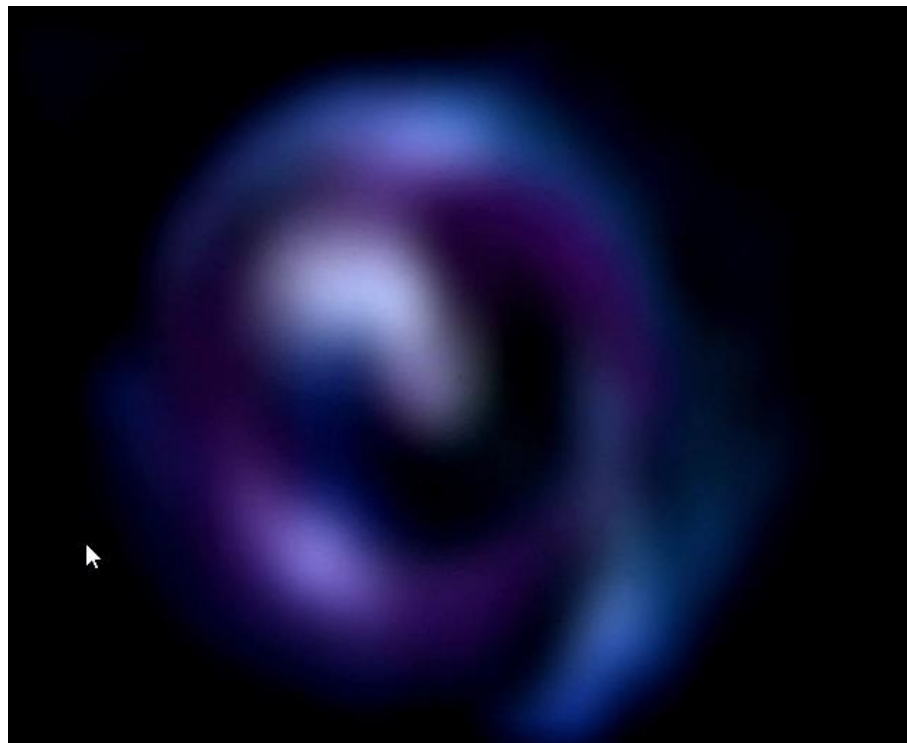
- Target **E**nhancer **R**eagent 15-30°C

Transcription mediated amplification

transkripciou sprostredkovaná amplifikácia



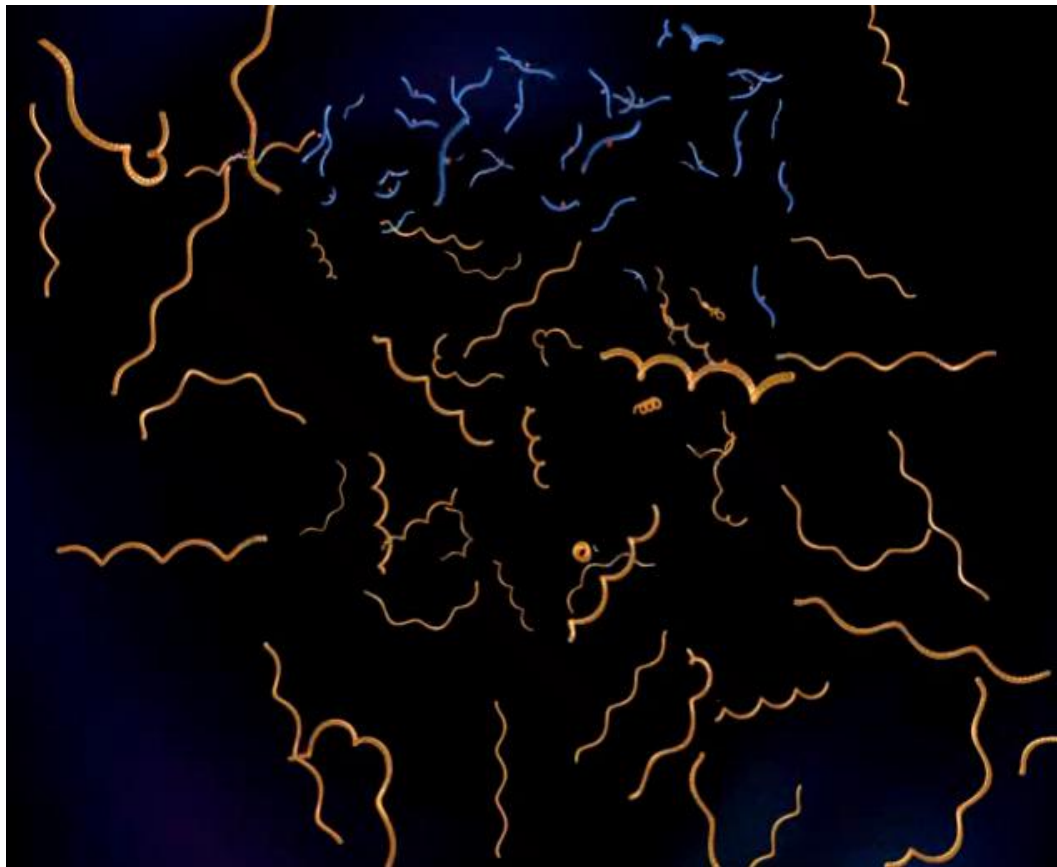
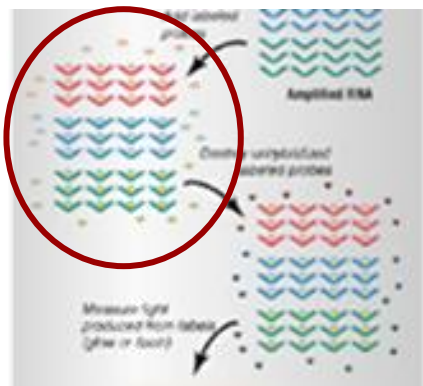
- **A**mplification reagent
 - **E**nzyme reagent
- 15 -35°C / 32°C / 2-8°C



Izotermická reakcia

Hybridizácia

P



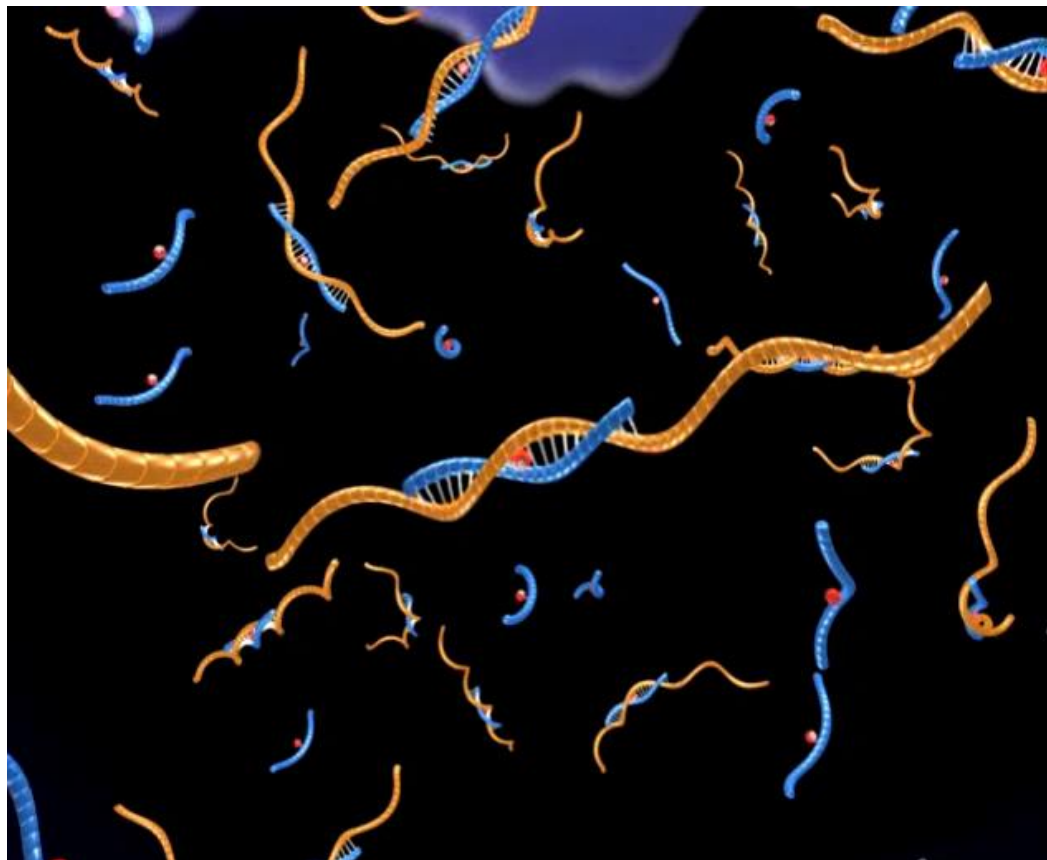
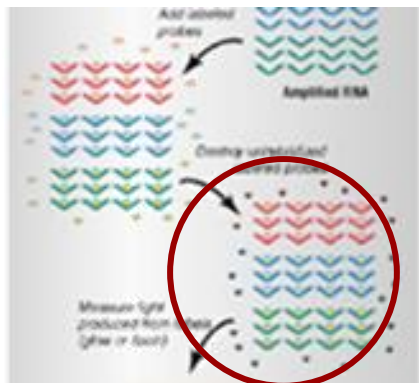
- **Probe** (HIV, HCV, HBV discriminatory probes) glow
(IC, HEV probe) flash
- acridínium ester

-15 až -35°C
2-8°C

32°C

Selekcja

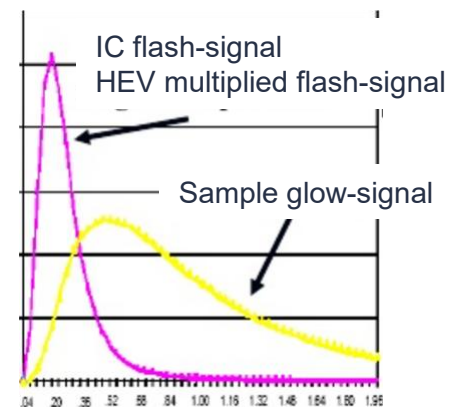
S



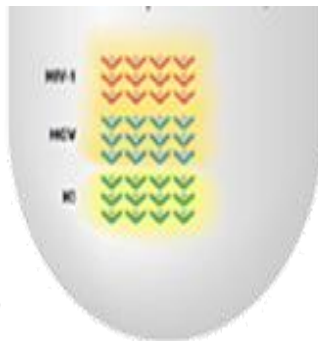
- Selection reagent

15 – 30°C

Duálna kinetická reakcia

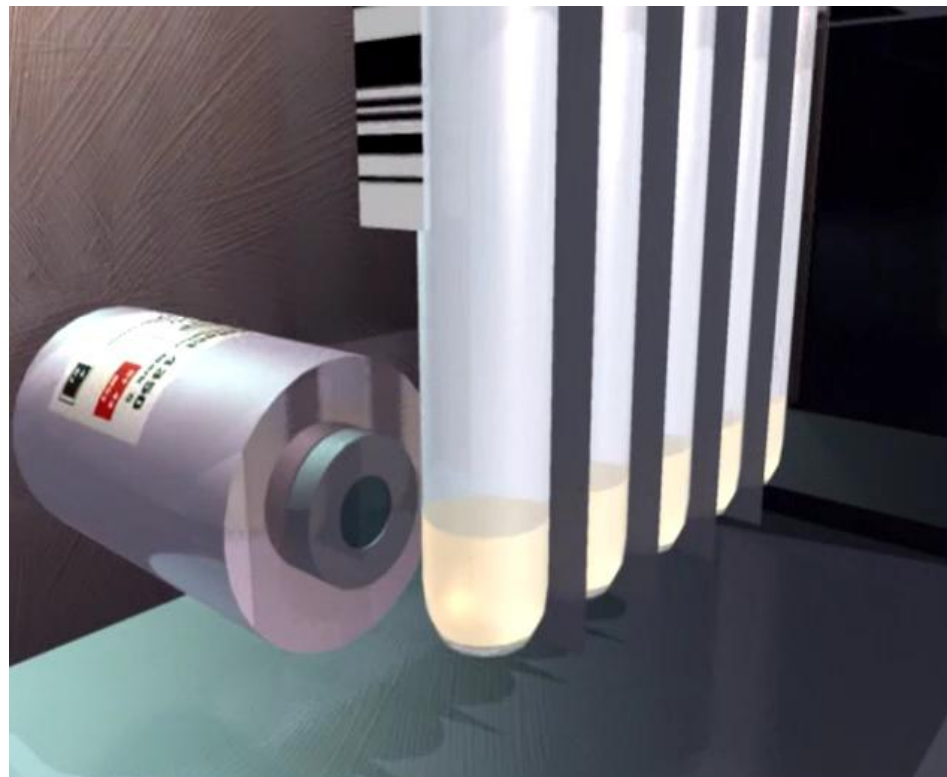


HIV-1
HBV
HCV
IC
HEV



- Autodetect 1
- Autodetect 2

15 – 30°C



Výsledky

**interpretácia
záchyt**

RESULTS BY WORKLIST REPORT

Serial Number:	209002628	System SW Version:	7.2.1.37	Date Range:	09/13/2023 17:00:53 to 09/13/2023 18:45:53
Assay:	UltrioPlex E				
Worklist IDs:	002628-20230913-11 Version: 2.0.5.10 (For In Vitro Diagnostic Use) ML: 705949 Exp: 02/15/2024 TCR: 00866 ICCutoff: 86069 HEV Cutoff: 598992 HIV/HCV/HBV Cutoff: 112532				
Operators:	admin				
Specimen Tested:	89	Reactive:	50		
Status Flag Legend:	SID - SampleID auto assigned by the system.				
Reviewed By:	_____	Date:	_____	Verified By:	_____
				Date:	_____

UltrioPlex E

Version: 2.0.5.10 (For In Vitro Diagnostic Use)

Worklist ID: 002628-20230913-11

Time	Rack-Tube #	Sample ID	IC Result	HIV/ HCV/ HBV RLU	HIV/ HCV/ HBV S/CO	Result	HEV S/CO	HEV Result	Flags
09/13/2023 17:00:53	010-01	Negative Calibrator - Lot 705972	Valid	4836	0.04	Valid	0.29	Valid	
09/13/2023 17:00:53	010-01	Negative Calibrator - Lot 705972	Valid	2769	0.02	Valid	0.29	Valid	
09/13/2023 17:00:53	010-01	Negative Calibrator - Lot 705972	Valid	2624	0.02	Valid	0.29	Valid	
09/13/2023 17:00:53	010-02	HEV Calibrator - Lot 705975	Valid	0	0.00	Valid	3.71	Valid	
09/13/2023 17:00:53	010-02	HEV Calibrator - Lot 705975	Valid	0	0.00	Valid	3.83	Valid	
09/13/2023 17:05:53	010-03	HIV Calibrator - Lot 705979	Valid	1271300	11.30	Valid	0.28	Valid	
09/13/2023 17:05:53	010-03	HIV Calibrator - Lot 705979	Valid	1373394	12.20	Valid	0.25	Valid	
09/13/2023 17:05:53	010-04	HCV Calibrator - Lot 705973	Valid	1097562	9.75	Valid	0.29	Valid	
09/13/2023 17:05:53	010-04	HCV Calibrator - Lot 705973	Valid	1060443	9.42	Valid	0.25	Valid	
09/13/2023 17:05:53	010-05	HBV Calibrator - Lot 705974	Valid	1002016	8.90	Valid	0.15	Valid	
09/13/2023 17:10:53	010-05	HBV Calibrator - Lot 705974	Valid	888519	7.90	Valid	0.18	Valid	
09/13/2023 17:10:53	010-06	AGSID0913230032	Valid	5029	0.04	Nonreactive	0.30	Nonreactive	SID
09/13/2023 17:10:53	010-06	AGSID0913230032	Valid	3494	0.03	Nonreactive	0.29	Nonreactive	SID
09/13/2023 18:20:53	008-04	UPE_PANEL A_705569	Valid	0	0.00	Nonreactive	3.87	Reactive	
09/13/2023 18:20:53	008-04	UPE_PANEL A_705569	Valid	0	0.00	Nonreactive	3.61	Reactive	
09/13/2023 18:30:53	008-05	UPE_PANEL B_705933	Valid	1369003	12.17	Reactive	0.20	Nonreactive	
09/13/2023 18:30:53	008-05	UPE_PANEL B_705933	Valid	1399966	12.44	Reactive	0.23	Nonreactive	

Interpretácia

Kalibrácia

- 250 testov
- 24h

$$s/co = 1$$

Interpretácia

INR < 1

IR ≥ 1 (retest 2x)

RR

Diskriminačný test

Záchyt HBV DNA, HCV RNA, HIV RNA

		HBV DNA (34) RR		HCV RNA (17) RR		HIV RNA (5) RR	
Rok	Počet vyšetření	prvodarca	starodarca	prvodarca	starodarca	prvodarca	starodarca
2019	95128	1	1				
2020	139441	7		2		1	
2021	138267	5	1	1	1		2
2022	155967	9		3	1		1
2023	166048	2		3			
2024	172644	3		2			1
2025	173401	5		4			
	1 040 896						
diagnostické okno		1					
okultná hepatitída B		2					

Záchyt HEV RNA, WNV RNA, HAV RNA

HEV RNA

Rok	Počet vyšetření	HEV RNA RR
2023	6252	6
2024	172644	127
2025	173401	72
	352 297	205

HAV RNA

Rok	Počet vyšetření	záchyt	hlášené	HAV RR
2025-26	15078	2	3	5

WNV RNA

Rok	Počet vyšetření	WNV RNA RR
2019	12637	0
2020	0	0
2021	0	0
2022	17124	0
2023	0	0
2024	15586	0
2025	18512	0
	63859	

Záver

- Zavedenie skríningu nukleových kyselín u darcov krvi a zložiek z krvi testovaných individuálne, skracuje obdobie detekcie:
- **HBV** infekcie o niekoľko týždňov pred detekciou HBsAg
- **HCV** infekcie o 55 dní pred detekciou aHCV
- **HIV** infekcie o 10 až 14 dní pred detekciou p24
- Rovnako znižuje riziko prenosu **HEV**, **WNV**, **HAV** transfúziou.
- Význam testovania:
- **HEV RNA** – z dôvodu pomerne vysokej prevalencie u DK
- **WNV** – v rámci plánu pripravenosti pre prípad endémie WNV v letných mesiacoch
- **HAV** – z dôvodu zvýšeného výskytu HAV v určitých regiónoch Slovenska
- NTS SR tým zabezpečuje efektívnu produkciu krvných komponentov s vysokou kvalitou a bezpečnosťou.



Ďakujeme