

Analiza i rezultati serološkog testiranja donora organa u Hrvatskoj 2006. – 2012.

Ivanka MIHALJEVIĆ¹⁾, dr. sc., mag. med. biochem.

Manuela MILETIĆ LOVRIC¹⁾, mag. med. biochem., specijalist medicinske biokemije
Melita BALIJA¹⁾, dr. sc., dr. med., specijalist transfuziolog

Irena JUKIĆ¹⁾, prim. dr. sc., dr. med., specijalist transfuziolog

Mirela BUŠIĆ²⁾, dr. sc., dr. med., specijalist epidemiolog

¹⁾Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Referentni centar Ministarstva zdravlja za transfuzijsku medicinu, Zagreb

²⁾Ministarstvo zdravlja Republike Hrvatske, Zavod za transplantaciju i biomedicinu, Zagreb

Ključne riječi

donori organa
serološko testiranje
transplantacija
infekcija

Key words

organ donors
serological tests
transplantation
infection

Primljeno: 2013–06–20

Received: 2013–06–20

Prihvaćeno: 2013–09–19

Accepted: 2013–09–19

Stručni rad

Uvod: Uspješnost transplantacije i preživljavanja presatka usko su povezani s odsustvom infekcije u primatelja. Infekcija primatelja je posljedica infekcije presatkom, reaktivacije latentnih infekcija primatelja, nozokomijalnih infekcija i kasnije, zbog doživotne imunopresije infekcija iz okoline.

Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu (HZTM) od 2006. provodi obvezna testiranja donora organa (DO) na uzročnike krvlju prenosivih bolesti (24h/7 dana) za potrebe cijele Hrvatske.

Materijal i metode: U razdoblju od 5.11.2006. – 31.12.2012. ispitano je u HZTM 642 uzoraka plazme DO pri čemu su korišteni testovi Abbott – Architect i bioMerieux – Vidas. U ovom radu analizirani su kvaliteta uzorka, brzina i rezultati testiranja na biljege infekcije virusima humane imunodeficiencije 1 i 2 (HIV), virusima hepatitisa B (HBV) i C (HCV), citomegalovirusom (CMV), Epstein-Barr virusom (EBV), *T. pallidum* i *T. gondii*.

Rezultati: Seroprevalencija EBV, CMV i *T. gondii* očekivano je visoka i iznosi 96,8 %, 92 % i 71 %. HIV pozitivnih među DO nije bilo, a biljege HBV infekcije, HBsAg i antitijela na HBcAg (anti-HBc) imalo je 0,5 % odnosno 8,9 % DO. U 1,3 % ispitanih dokazan je HCV antigen, a antitijela na virus hepatitisa C (anti-HCV) bila su pozitivna u njih 1,6 %. Učestalost treponemskih antitijela bila je 0,8 %. 2,5 % uzoraka bilo je razrijeđeno više od 50 %, a prosječno vrijeme testiranja DO bilo je 2,04 sata.

Zaključak: Rezultati testiranja DO upućuju na primjerenost odabranih testova i algoritama testiranja kao i metoda selekcije DO u donorskim bolnicama, a prevalencije patogena sukladne su epidemiološkim karakteristikama opće populacije.

Analysis and the results of serological testing of Croatian organ donors from 2006 to 2012

Professional paper

Introduction: The success of transplantation and graft survival are closely related to the absence of infection in transplant recipients through infected graft, reactivated recipient's latent infections, nosocomial infections and community acquired infections.

Since 2006, the Croatian Institute of Transfusion Medicine has been providing mandatory testing of organ donors (OD) for bloodborne pathogens (24/7) for the entire country.

Materials and methods: In the period from 5.11.2006. to 31.12.2012. a total of 642 organ donor plasma samples were tested by means of Abbott – Architect and bioMerieux – Vidas tests. In this paper, the quality of samples measured against rate of dilution, turnaround time and prevalence of human immunodeficiency virus (HIV), hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV), *T. pallidum* and *T. gondii* markers were analyzed.

Results: Seroprevalence of EBV, CMV and *Toxoplasma gondii* was as high as expected (96.8 %, 92 % and 71 %, respectively). There were no HIV positive OD, while in 0.5 % HBsAg, in 8.9 % anti-HBc, in 1.6 % anti-HCV, in 1.3 % HCV Ag and in 0.8 % *T. pallidum* Ab were found positive. 2.5 % of the samples were diluted by more than 50 % and the average testing time per OD was 2.04 hours.

Conclusion: The results indicate the adequacy of organ donor selection methods in donor hospitals, appropriate tests and testing algorithms used. The prevalence of pathogens is in accordance with epidemiological characteristics of the general population.

Uvod

Transplantacija je najučinkovitiji oblik liječenja otkazivanja funkcije organa. U održavanju presatka primjenjuje se trajna imunosupresivna terapija koja kao komplikaciju nosi opasnost od infekcije i malignih bolesti. Infekcije, najčešće virusne, koje se javljaju tijekom imunosupresije mogu dovesti do gubitka tolerancije i izazvati odbacivanje presatka, zbog čega je otkrivanje i sprečavanje infekcije važan dio transplantacijskog postupka [1 – 3].

Nekoliko je izvora infekcije primatelja organa:

- organ odnosno donor organa (DO)
- sam primatelj (latentne infekcije često specifične za bolestan organ)
- infekcije povezane s boravkom u bolnici i medicinskim zahvatima (nozokomijalne infekcije)
- okolina i kontakti tijekom života nakon transplantacije.

Među infekcijama najučestalije su bakterijske infekcije koje se pojavljuju kod primatelja svih organa, a najviše u primatelja jetre i pluća, 33 – 68 %. Od virusnih je to infekcija citomegalo-virusom (CMV) posebno među primateljima domino presadaka: pluća/srce ili bubreg/pankreas, 50 – 75 %. Ostale postransplantacijske infekcije specifične za organ su: za bubreg herpes simplex virus infekcije (HSV) 53 %, za pankreas *Candida spp.* 32 %, dok su infekcije micelijanskim gljivama učestalije kod primatelja domino presadaka pluća/srce, 3 – 19 %. Pojava postransplantacijskih infekcija korelira s kirurškim komplikacijama, stupnjem imunosupresije i izloženosti infekciji povezanoj s epidemiološkim karakteristikama okoline primatelja. Od važnosti su i latentne infekcije donora i primatelja poput tuberkuloze, herpesvirusnih infekcija, infekcije parazitima, a koje se reaktiviraju pod imunosupresijom [1, 3].

Prijenos infekcije s donora na primatelja je rijedak i u postransplantacijskim komplikacijama ima mali udio, oko 1 %, što se tumači dobrom selekcijom donora, obveznim testiranjem na zarazne bolesti i preventivnim djelovanjem [4, 5].

Opasnost prijenosa akutne zaraze s donora na primatelja postoji i kada se testiranjem biljega infekcije dobije negativan rezultat (*window period* infekcije i okultne infekcije) ili se kod donora prisutna zaraza za koju nije predviđeno obvezno testiranje ne uoči. Obvezno je tako kod donora s povišenom temperaturom napraviti hemokulturu i urinokulturu u isključivanju virulentnih bakterija poput *Staphylococcus aureus* ili *Pseudomonas aeruginosa*. U literaturi su opisani slučajevi prijenosa mnogih uzročnika prikazanih u tablici 1 [6].

Nozokomijalne infekcije uglavnom obuhvaćaju teško liječive rezistentne sojeve bakterija poput meticilin rezistentnog *Staphylococcus aureus* (MRSA) ili vankomicin rezistentnog enterokoka, flukonazol rezistentne *Candida*

Tablica 1. Uzročnici preneseni transplantacijom organa
Table 1. Pathogens transmitted by grafts

Uzročnici preneseni transplantacijom organa / Pathogens transmitted by grafts	
Virusi/Viruses	Bakterije/Bacteria
Cytomegalovirus	<i>Staphylococcus aureus</i>
Epstein-Barr virus	<i>Klebsiella species</i>
Herpes simplex virus	<i>Bacteroides fragilis</i>
Varicella-zoster virus	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Humani herpesvirus-6, 7 i 8	<i>Escherichia coli</i>
Hepatitis B, C, D, E	<i>Salmonella species</i>
Virus humane imunodeficijencije 1, 2	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Parvovirus B19	<i>Treponema pallidum</i>
Rabies	<i>Brucella species</i>
Limfocitni koriomeningitis virus	<i>Bartonella species</i>
Virus Zapadnog Nila	<i>Enterobacter species</i>
BK virus	<i>Acinetobacter species</i>
	<i>Borrelia species</i>
Mikobakterije/Mycobacteria	Gljive/Fungi
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Aspergillus species</i>
Netuberkulozne mikobakterije	<i>Candida species</i>
	<i>Histoplasma capsulatum</i>
Paraziti /Parasites	<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Coccidioides immitis</i>
<i>Strongyloides stercoralis</i>	<i>Scedosporium apiospermum</i>
<i>Plasmodium species</i>	<i>Prototheca species</i>
<i>Trypanosoma cruzi</i>	

spp. ili *Clostridium difficile* i *Aspergillus spp.* kao i rezistentnih sojeva Gram-negativnih bakterija. Infekcije iz okoline koje bolesnik može steći tijekom života su virusi influence, bakterije koje izazivaju pneumoniju ili gastrointestinalne smetnje i atipične infekcije rinovirusima, adenovirusima, mikoplazmom, legionelom i klamidijom, kao i infekcije povezane s putovanjima primatelja u daleke zemlje [1, 3].

Infekcije primatelja organa različito brzo se pojavljuju. U prvih mjesec dana dok imunosupresija još nije dosegla potrebnu razinu, oportunističke infekcije izostaju, pojavljuju se virusne infekcije ili infekcije gljivama vezane uz organ ili primatelja, a najčešće su to nozokomijalne infekcije ili kolonizacije rane ili sluznica uzročnicima poput *Pseudomonas aeruginosa* i *Aspergillus spp.* [3]. Infekcije virusom zapadnog Nila (WNV), virusom limfocitnog koriomeningitisa (LCMV), virusima humane imunodeficijencije 1 i 2 (HIV1 i HIV2), virusom bjesnoće su opisane, ali su iznimno rijetke [7 – 10]. U periodu od 2 – 6 mjeseci

nakon transplantacije, a što ovisi o patogenu, stanju presatka, intenzitetu i optimiranju imunosupresivne terapije, pojavljuju se infekcije virusom polioima BK i adenovirusima, infekcije *Mycobacterium tuberculosis* ili *Cryptococcus neoformans*. U tom vremenu pojavljuju se i infekcije virusima hepatitisa B (HBV) i hepatitisa C (HCV), infekcije herpesvirusima i niz bakterijskih infekcija, ako za iste u primatelja nije provedena imunoprofilaksa. Kasnije tijekom života opisane su HBV i HCV infekcije, CMV kolitis i retinitis, HSV encefalitis i infekcije vezane uz epidemiološka kretanja u području u kojem primatelj obitava [1, 4, 6]. Važno je također uzeti u obzir da se neke od infekcija neće prezentirati upalnim odgovorom i simptomima ili će oni biti zamijenjeni simptomima akutnog ili kroničnog odbacivanja presatka. Sve infekcije za koje postoje preventivne mjere poput cijepljenja i liječenja nisu prepreka transplantaciji, bitno je da se iste pravovremeno provedu.

Testiranje primatelja i DO na zarazne bolesti

U Hrvatskoj je transplantacija organa zakonom uređena [11, 12]. DO su osobe kod kojih je ustanovljena smrt mozga, s poznatim uzrokom smrti, bez aktivne maligne bolesti, za koje je heteroanamnezom (rodbina, odabrani liječnik) utvrđeno da nisu imali rizik od zaraznih bolesti poput HIV-a u prethodnih 12 mjeseci i za koje liječničkim pregledom nisu utvrđeni znakovi diseminirane akutne ili kronične zarazne bolesti.

Bolesnici, kandidati za transplantaciju, moraju biti prije transplantacije izliječeni od aktivne infekcije. Procjeniti se mora i postojanje latentnih infekcija kod primatelja pored onih za koje se provodi testiranje, ne samo zbog reaktivacije istih pod imunosupresijom, već zbog sparivanja s potencijalnim donatorom organa. U tom pogledu treba se primatelj ispitati na bakterije, gljive, parazite i viruse [7, 8]. Primatelji organa se ispituju kao i donori organa na najučestalije i najteže krvlju prenosive bolesti, ali dodatno još i na varicella zoster virus, koji nije obavezan u DO. Obvezno serološko i molekularno testiranje DO na krvlju prenosive bolesti provodi se u akreditiranim laboratorijima, testovima visoke osjetljivosti, kojima se postiže visoka prediktivna vrijednost negativnog rezultata testa [13]. U Hrvatskoj od pristupanja Eurotransplantu 2006., testiranje svih DO provodi se u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu u Zagrebu, 24 sata/7 dana (ISO 9001: 2008; LRQA od 2001. i Akreditacija HRN EN ISO 15189: 2008; Hrvatska akreditacijska agencija). Obvezni testovi kojima se ispituje krv DO u Hrvatskoj i godina kada se testiranjem na neki od biljega započelo prikazani su u tablici 2.

Testiranje DO provodi se temeljem algoritma različitog od algoritma testiranja davatelja krvi. Tako se u slučaju pozitivnog inicijalnog testa primjenjuje alternativni test i/ili potvrdni test, čiji negativan rezultat kvalificira or-

Tablica 2. Obvezni testovi u ispitivanju donora organa

Table 2. Mandatory tests for organ donor testing

	Naziv testa/ Test	Krvlju prenosivi uzročnici/ Bloodborne pathogens
1.	*ID-NAT triplex test na HIV1-RNA, HCV-RNA, HBV-DNA	HBV, HCV, HIV-2006.
2.	HBsAg	HBV-2006.
3.	Anti-HBs	
4.	Anti-HBc	
5.	Anti-HCV	HCV-2006
6.	**HCV Ag kvantitativni test	
7.	HIV Ag/Ab	HIV-2006
8.	Anti-TP	<i>T. pallidum</i> -2006.
9.	Anti-Toxo IgG	<i>T. gondii</i> -2006.
10.	Anti-Toxo IgM	
11.	Anti-CMV IgG	CMV-2006.
12.	Anti-CMV IgM	
13.	***Anti-EBV-VCA IgM	EBV-2010.
14.	Anti-EBV-VCA/EA IgG	
15.	Anti-EBNA-IgG	

* Obavezni ID-NAT u primjeni je od 1.03.2013./ Mandatory since March 1st, 2013

** Ne izvodi se od uvođenja obaveznog molekularnog testa / Not used since ID-NAT test implemented

*** U dokazivanju anti-EBV 2009. korišten je test na heterofilna antitijela, a od 2010 anti-EBV testovi. / Heterophilic antibodies test used in the detection of EBV in 2009 was replaced with specific EBV antibody tests in 2010.

gane za transplantaciju. Kod davatelja krvi inicijalan test mora biti negativan da bi se krv primijenila. Pozitivan rezultat serološkog i/ili molekularnog testa nije apsolutna kontraindikacija za darivanje organa osim u slučaju potvrđene HIV-infekcije, kada se organi, u većini zemalja ne prihvaćaju za transplantaciju [14, 15]. Iznimno od toga, u nekim zemljama Eurotransplant-a postoje transplantacijski centri koji prihvaćaju i HIV-pozitivne organe za HIV-pozitivne primatelje kao i u SAD gdje je to 2013. ozačeno [16]. Odluka o transplantaciji organa davatelja s pozitivnim serološkim testovima je na transplantacijskom centru koji procjenjuje rizik od infekcije temeljem serostatusa primatelja, organ specifičnog rizika i mogućnosti preventivnog ili preemtivnog liječenja [17, 18]. Ipak najčešći razlog presađivanja organa zaraženog DO je vitalno ugrožen primatelj i kontinuirani nedostatak organa za presađivanje.

U tom pogledu terapijske mogućnosti (preventivne ili preemtivne) su odlučujuće. Tako je omogućeno presađivanje CMV pozitivnog organa CMV negativnom primatelju primjenom ganciklovira/valganciklovira ili aci-

klovira. Organi HBsAg pozitivnih ili anti-HBc pozitivnih DO (osim jetre) mogu se uz terapiju lamivudinom i imuno-profilaksu hepatitis B-imunoglobulinom (HBIg) presaditi HBV negativnim primateljima. Jednako tako je antivirusna terapija indicirana kod dokazane HCV i EBV infekcije donora organa. Terapijom se može prevenirati infekcija primatelja i *T. gondii*, kao i većine oportunističkih infekcija [19, 20].

Za sigurnost presatka pored kvalitetnih testova u ispitivanju DO od važnosti je i kvaliteta ispitivanog uzorka krvi DO. Uzorak krvi ne smije biti razrijeđen više od 50 %, transfuzijama krvnih pripravaka, koloida i/ili kristaloida [12, 21]. Razrjeđenje se izračunava uspoređivanjem volumena krvi/plazme DO s volumenom krvnih pripravaka i drugih infuzija koje je DO u zadanom vremenu primio. Za testiranja DO koji će primati transfuziju ili infuziju, preporuča se koristiti prijetransfuzijski uzorak krvi koji je čuvan do 7 dana pri temperaturi 2 – 8 °C. O potrebi osiguranja adekvatnog uzorka krvi DO za potrebe kvalitetnog serološkog testiranja na zarazne bolesti važno je upoznati bolničke transplantacijske koordinate i osobe koje sudjeluju u pripremi i procjeni prihvatljivosti DO.

Materijal i metode

Uzorci DO: Za svakog DO zaprimljena su dva uzorka pune krvi uzete u PPT epruvete (engl. *Plasma Preparation Tube*). Uzorak plazme pripremljen je centrifugiranjem PPT epruvete 10 minuta pri 2500 o/min u donorskoj bolnici ili u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu u propisanom vremenu, a prema Preporukama za osiguranje kvalitete testiranja donora organa na krvlju prenosive bolesti koje je HZTM izdao 2007., 2009. i 2013. godine. PPT epruvete nakon centrifugiranja i testiranja su arhivirane na $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ na period od 11 godina. Uzorci plazme su evaluirani organoleptički na bilirubinemiju, hemolizu, omjer stanica i plazme i lipemiju, a u slučaju odstupanja od prihvatljive razine je napravljen zapis i osvrt u komentaru nalaza. Za svakog DO donorska bolnica procijeni volumen krvi i plazme prema Nadlerovoj formuli [22] ili Gilcherovoj formuli [23] temeljenoj na prosječnom volumenu krvi ili plazme po kilogramu tjelesne težine (70 mL/40 mL), a prema obrascu 572, slika 1.

U slučaju da se radi o DO koji je izrazito mišićav ili pretio ili je DO dijete, treba primijeniti pravilo Gilhera, koje uključuje samo procjenu mase prokrvljenih tkiva.

U periodu od 5.11.2006. – 31.12.2012. ispitano je u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu 642 uzorka krvi DO. Rezultati su pregledani i validirani prema zadanim kriterijima proizvođača, a pozitivni retestirani prema važećim algoritmima HZTM. Tako u slučaju da je od biljega HBV-infekcije samo anti-HBc bio pozitivan, dodatno je uzorak ispitan alternativnim anti-HBc testom i na ostale biljege HBV-infekcije, a najmanje na anti-HBc IgM. U

slučaju pozitivnog rezultata HIV Ag/At, ispitivanje se ponavljalo alternativnim testovima za HIV Ag/At, anti-HIV i HIV-1 p24 Ag. Anti-HCV pozitivan rezultat bez pozitivnog HCV antigena (HCV Ag) ponavljan je alternativnim anti-HCV testom. Ukoliko je test na HBsAg bio pozitivan uz pozitivan anti-HBc rezultat HBsAg se nije dodatno ponavljao, a kada je anti-HBc bio negativan rađen je HBsAg neutralizacijski test. Rezultati testiranja su prijavljeni na Nacionalnu mrežu na Internetu i dostupni su bili svima uključujući i Eurotransplant.

Testovi: Serološko testiranje se provodilo testovima Abbott Laboratories SAD, na analizatoru Architect i 2000_{SR}, i testovima bioMerieux Francuska, na analizatorima miniVidas i Vidas. Molekularno testiranje čije rezultate ne prikazujemo u ovom radu, provodilo se samo na zahtjev transplantacijskog centra i to donorima s utvrđenim rizičnim ponašanjem, i onima čiji su uzorci bili u serološkom testu na HBV i/ili HCV pozitivni. Tako se anti-HCV pozitivnim DO određivala količina HCV-RNA i genotip, a HBsAg pozitivnima ili anti-HBc pozitivnim određivala se količina HBV-DNA u krvi.

Svrha: Svrha ovog rada je analizirati kvalitetu zaprimljenih uzoraka DO, brzinu obveznog serološkog testiranja u HZTM i učestalost biljega infekcije HIV, HBV, HCV, CMV, EBV, sifilis i *T. gondii* u donora organa Hrvatske u periodu od 2006. – 2012. godine, prije uvođenja obveznog molekularnog ID-NAT triplex testa.

Rezultati

1) Analiza kvalitete uzorka krvi DO temeljem zaprimljene popratne dokumentacije donorske bolnice

U tablici 3 prikazani su podaci o dokumentaciji vezanoj uz uzorak krvi DO. Sve do 2011. godine veliki udio uzoraka krvi DO zaprimljen je i testiran bez podataka o mogućem razrjeđenju. Ispitivanja su rađena uz suglasnost koordinatora, a nalaz je sadržavao obvezni komentar o nepouzdanosti dobivenih rezultata testiranja, a zbog manjkave dokumentacije. Godine 2010., 2011. i 2012. došlo je do značajnog poboljšanja u radu donorskih bolnica, koje je uslijedilo nakon izdavanja nove radne upute koordinatorima za uzimanje i pripremu uzorka i njihove edukacije 2009.

2) Analiza stupnja razrjeđenja zaprimljenih uzoraka krvi DO

Analiza podataka vezanih uz procjenu razrjeđenja krvi prikazana je u tablici 4. Stupanj razrjeđenja je odvojeno prikazan za krv i za plazmu. Podaci za plazmu relevantni za serološko testiranje pokazuju da je 2,5 % uzoraka bilo suviše razrijeđeno, odnosno samo 2,5 % DO je tijekom liječenja u zadanom vremenu primilo volumen krvnih

OBRAZAC ZA UTVRĐIVANJE RAZRJEĐENJA KRVI/PLAZME DONORA ORGANA

Donor ID _____

Težina DO u kg _____ Podatke uvrsti u formule i izračunaj:

VK/ volumen krvi u mL = težina DO x 70 = _____ ili težina DO x GF* () = _____

VP/volumen plazme u mL = težina DO x 40= _____ ili težina DO x GF*() = _____

A. Upiši koliko je DO primio krvi u zadnjih 48 sati koji prethode uzimanju uzorka:

Volumen pune krvi	mL
Volumen koncentrata eritrocita	mL
UKUPNO transfundirano	A = mL

B. Upiši koliko je DO primio koloida u zadnjih 48 sati koji su prethodili uzimanju uzorka:

Volumen dextrana	mL
Volumen koncentrata Tr	mL
Volumen plazme	mL
Volumen albumina	mL
Volumen drugih koloidnih tekućina	mL
	mL
UKUPNO transfundirano	B = mL

C. Upiši koliko je DO primio kristaloida 1 sat prije uzimanja uzorka

Volumen fiziološke otopine	mL
Volumen dekstroze	mL
Volumen Ringer laktata	mL
Volumen ostalog	mL
UKUPNO: transfundirano	C = mL
UKUPNO	B+C= mL
UKUPNO	A+B+C= mL

Zaokruži odgovor! Da li je B+C > (veće) od VP ? DA NE

Zaokruži odgovor! Da li je A+B+C > (veće) od VK ? DA NE

Ako je odgovor na oba pitanja NE uzorak je prihvatljiv za testiranje.
Ako je odgovor na jedno ili oba pitanja DA uzorak je suviše razrijeđen i nije adekvatan za testiranje! HZTM će zatražiti odobrenje koordinatora pri MZ za serološko testiranje DO.

Glitcher-ovo (*GF) pravilo za procjenu volumena krvi i plazme po kg tjelesne težine

Donori organa	mL krvi (plazme)/kg tjelesne težine			
	pretili	mršavi	„normalni“	mišićavi
muškarci	60 (34)	65 (37)	70 (40)	75 (43)
žene	55 (31)	60 (34)	65 (37)	70 (40)
dojenčad/djeca	-	-	80 (46)/70(40)	-

OB-572/01

Slika 1. Obrazac za procjenu razrjeđenja krvi/plazme donora organa prema Preporukama za osiguranje kvalitete testiranja donora organa na krvlju prenosive bolesti (HZTM, 2013.)

Figure 1. Blood/plasma dilution form according to Guidelines for quality assurance of blood borne diseases testing of organ donors (CITM, 2013)

Tablica 3. Učestalost uzoraka DO bez podataka o razrjeđenju
Table 3. Proportion of organ donor samples without dilution data

Godina/Year	Broj donora organa / Number of organ donors	Broj uzoraka bez podataka o razrjeđenju / Number of samples without dilution data	%
2006.	3	3	100
2007.	25	25	100
2008.	85	49	58
2009.	85	33	39
2010.	136	34	25
2011.	151	3	2
2012.	157	0	0
Ukupno/Total	642	147	23

Tablica 4. Razrjeđenja uzoraka DO zaprimljenih na testiranje
Table 4. Dilution data for organ donor samples received for testing

Udio uzoraka u % / Proportion of samples in %	% Razrjeđenja / % dilution				
	<10	11–25	26–40	41–50	>50
s razrjeđenjem krvi / with blood dilution	79,1	15,2	3,3	0,8	1,7
s razrjeđenjem plazme / with plasma dilution	54,5	35,8	5,8	1,4	2,5

pripravaka, koloida i kristaloida veći od ukupno procijenjenog volumena plazme. Većina (90 %) uzoraka bila je razrijeđena manje od 25 %, što nije imalo učinka na kvalitetu rezultata testiranja. Svi razrijeđeni uzorci DO ispitani su serološkim testovima uz suglasnost transplantacijskog koordinatora istim testovima kao i nerazrijeđeni uzorci DO, a u nalazu je naveden komentar da rezultati serološkog testiranja zbog razrjeđenja nisu pouzdani. Ovaj komentar na engleskom jeziku je bio vidljiv i svim transplantacijskim centrima Eurotransplanta.

3) Analiza brzine testiranja uzorka krvi DO od zaprimanja do ispisa rezultata testiranja

Prema evidenciji u informatičkom sustavu Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu za 626 uzoraka DO, od upisa pri zaprimanju uzorka do ispisa rezultata testiranja prosječno je u ispitivanom periodu prošlo 2,04 sati. Većina uzoraka DO (89,6 %) ispitano je unutar 3 sata, 7,5 % uzoraka unutar 3 – 4 sata, a ispitivanje 2,9 % uzoraka DO trajalo je duže od 4 sata, najčešće zbog kvara opreme ili potvrdnog testiranja (tablica 5). Tijekom godina brzina testiranja nije se znatnije mijenjala.

Tablica 5. Brzina testiranja krvi DO u razdoblju 2006. – 2012. godine

Table 5. Organ donor blood testing turnaround time in the period 2006–2012

Trajanje testiranja / Duration of testing	Broj uzoraka / Number of samples	Prosječno sati / Average hours	%	
<1 h	4	0,52	0,6	89,6 %
1-2 h	265	1,43	42,3	
2-3 h	292	2,20	46,7	
3-4 h	47	3,23	7,5	7,5 %
>4 h	18	5,60	2,9	
Ukupno/Total	626	2,04	100	

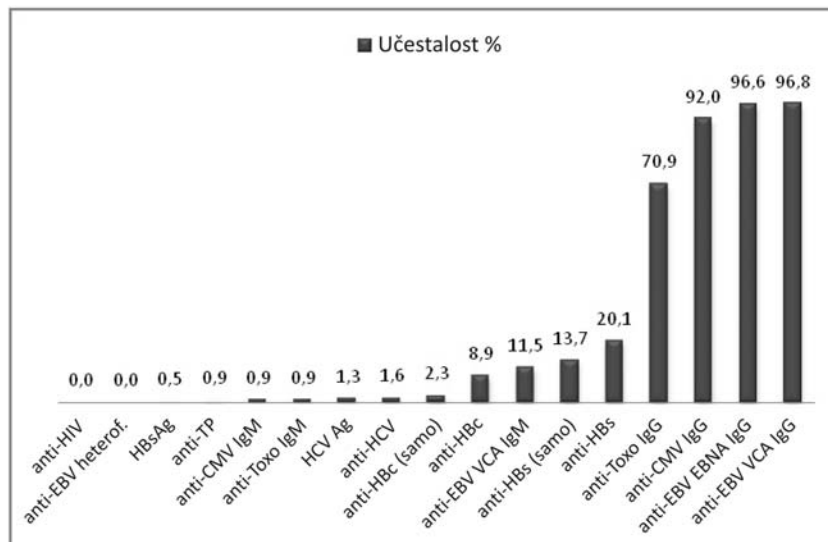
4) Analiza učestalosti biljega krvlju prenosivih bolesti u DO 2006. – 2012.

Na slici 2. prikazana je učestalost pozitivnih rezultata seroloških testova na biljege krvlju prenosivih bolesti dobivenih ispitivanjem uzoraka DO.

Biljezi najveće učestalosti su antitijela IgG klase za EBV, 96,8 %. Kombinacije antitijela anti-EBV EBNA IgG, anti-EBV VCA IgM i anti-EBV VCA/EA IgG u 370 od ukupno 443 ispitana DO odgovarale su tipičnom nalazu latentne odnosno davno stečene EBV infekcije (anti-EBV VCA IgM negativan, anti-EBV EBNA IgG pozitivan i anti-EBV VCA/EA IgG negativan), a 20 DO je imalo atipičan nalaz kombinacije ovih antitijela koji se jednako tumači. Samo tri DO nisu imali biljege EBV infekcije od kojih su dva dječje dobi. Nalaz EBV antitijela u 49 ispitanih upućivao je na moguću kasniju fazu akutne infekcije ili reaktivaciju virusa, naime nalaz sva tri testa na EBV antitijela bio je pozitivan (anti-EBV EBNA IgG, anti-EBV VCA IgM i anti VCA/EA IgG). Serološku sliku moguće rane infekcije (samo anti-EBV VCA IgM pozitivan), iako bez prisutnih heterofilnih antitijela, imao je samo 1 DO.

Seroprevalencija CMV od 92 % zabilježena je ispitivanjem 637 uzoraka DO. Od 637 ispitanika 50 (7,8 %) nije imalo serološke biljege ove infekcije, a istovremeni nalaz IgG i IgM klase antitijela imalo je 6 ispitanih ili 0,9 % DO. Prema očekivanju seroprevalencija IgG antitijela na *T. gondii* je također bila visoka, 70,9 %. Znakove preboljene infekcije i imunost imalo je 445/642 ispitanih DO (anti-Toxo IgM negativan, anti-Toxo IgG pozitivan). Šest ispitanika imalo je oba antitijela pozitivna što je upućivalo na moguću infekciju unutar 1 – 2 godine prije moždane smrti.

HIV-infekcija nije dokazana u 642 ispitana donora organa. HBV-infekcija nađena je u 3 od 642 DO ili 0,47 % ispitanih. Učestalost ostalih biljega HBV-infekcije je bila veća, tako je 57/642 ispitanika imalo anti-HBc pozitivan test ili 8,9 %, od kojih je većina 41/57 (72 %) imala i zaštitna antitijela, anti-HBs. Solitarni nalaz anti-HBc, koji može



Slika 2. Učestalost biljega krvlju prenosivih bolesti u donora organa ispitanih u razdoblju 2006. – 2012. (%)
Figure 2. The frequency of blood borne markers in organ donors tested in the period 2006–2012 (%)

biti biljeg okultne HBV infekcije, imalo je 16 od 57 anti-HBc pozitivnih ispitanika. Među DO bilo je 88 DO s pozitivnim antitijelima anti-HBs, a bez drugih biljega HBV-infekcije u kojih je nalaz uglavnom rezultat provedenog cijepljenja protiv hepatitisa B. Zarazu virusom hepatitisa C dokazali smo u 1,3 % DO (pozitivan kvantitativni HCV Ag test). Anti-HCV pozitivnih bilo je 1,6 %, a sifilis 0,8 % ispitanih osoba. Nespecifične reaktivnosti inicijalnog testiranja bile su iznimno rijetke i nisu predstavljale poteškoću u ispitivanju naše populacije DO budući se radilo o donorima s održanom cirkulacijom krvi (engl. *hearth beating*), a ne donorima nekucajućeg srca (engl. *non-hearth beating*). Hemoliza i ikterus nisu bili povezani s nespecifičnim reaktivnostima testova.

Rasprava

Kriteriji prihvatljivosti organa za transplantaciju zbog nedovoljnog broja organa, razlikuju se od centra do centra te mogu biti prošireni posebno u zemljama s malim brojem DO. Zbog toga se traže i razvijaju načini povećanja iskoristivosti organa, najviše kroz prevenciju infekcije u primatelja, pa je danas moguće transplantirati organe DO s latentnim i potvrđenim infekcijama [24]. Nova efikasnija terapija virusnih hepatitisa također je povećala mogućnost iskoristivosti organa [25, 26]. Međunarodno udruživanje nacionalnih transplantacijskih centara u međunarodne asocijacije ili organizacije za razmjenu organa, kao što su Eurotransplant (Njemačka, Austrija, Belgija, Nizozemska, Luxemburg, Slovenija, Hrvatska i Mađarska) ili Scandiatransplant (Danska, Švedska, Finska i Norveška) ili Balttransplant (Estonija, Latvija i Litva), također uspješno smanjuje gubitak organa, između ostalog primjenom proširenih kriterija prihvatljivosti organa.

Gubitak organa zbog slabe specifičnosti odabranih testova (lažno pozitivni rezultati testiranja) ili organizacijskih propusta u bilo kojoj aktivnosti od donorske bolnice do primatelja nije prihvatljiv. Testiranje DO mora se provesti u kontroliranim, standardiziranim uvjetima i u što kraćem vremenu. Pri tome su važni testovi, po mogućnosti validirani na uzorcima kadaveričnih DO, te algoritmi potvrde inicijalnih reaktivnosti, što podrazumijeva alternativni i potvrdni test dostupan u istom laboratoriju/ustanovi. Uzorci krvi uzeti od DO po prestanku cirkulacije često dovode do lažnih reaktivnosti u serološkim testovima, posebno ako su uzeti nakon 22 sata od prestanka cirkulacije [27, 28]. U Engleskoj se čak 7 % organa gubilo zbog loše kvalitete uzorka i neprimjerenog algoritma validacije pozitivnih rezultata seroloških testova do 2009. kada je primijenjen algoritam koji se u Hrvatskoj (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu) primjenjuje od 2006. Prema autorima primjena ovog algoritma koji uključuje alternativni i potvrdni test, a ne ponavljanje istim testom kao u davatelja krvi, značajno smanjuje postotak gubitka organa za transplantaciju [29].

Na pouzdanost rezultata testiranja može utjecati razrjeđenje uzorka krvi DO. U algoritmu optimalnog zbrinjavanja DO najčešće se primjenjuju nadoknada volumena krvi infuzijskim otopinama i/ili krvnih stanica transfuzijama krvnih pripravaka, u cilju održanja hemodinamske stabilnosti i adekvatne perfuzije organa za presađivanje. Pravilo od dopuštenih 50 % razrjeđenja uzorka uvedeno prvo u SAD, nakon što je testiranjem razrijeđenog uzorka i lažno negativnog rezultata HIV-testa došlo do prijenosa HIV-a na primatelje organa [30], postalo je opće prihvaćeno. U literaturi, osim opisanog slučaja prijenosa, nema podataka koji bi podržali ovo pravilo. Ispitivanja serije razrjeđenja anti-HIV slabo pozitivnih uzoraka pokazala su da tek razrjeđenja od 200 % (1:5) mogu dati negativan

rezultat testa [31]. Za visoko pozitivne HBsAg, anti-HCV i anti-HIV uzorke krvi simulacije terapijskih razrjeđenja pokazala su da ona mogu biti znatno veća od dozvoljenih 50 % (1:2), bez učinka na konačan rezultat testa. Za HBsAg i anti-HIV to je 1:20 000, a za anti-HCV čak 1:30 000 [32]. Moguće je kod velikog gubitka krvi raspravljati o brzini nadoknade imunoglobulina (anti-HIV, anti-HCV) ili drugih proteinskih biljega (antigena) infekcije i reprezentativnosti uzetog uzorka krvi. Poznato je da je za redistribuciju imunoglobulina iz intersticijalnog prostora u krv potrebno barem 24 sata.

Brzina izvođenja seroloških testova pridonosi kvaliteti organa jer skraćuje vrijeme zbrinjavanja DO, a znatno je povećana uporabom enzim-imuno testova utemeljenih na kemiluminiscenciji ili fluorescenciji. Osim velike površine na kojoj se reakcija specifičnih antitijela i antigena patogena odvija kod ovih testova, što skraćuje vrijeme testiranja, nastali kompleks identificira se emisijom svjetla koju je lako izmjeriti i tako detektirati male količine ispitivanog biljega što ovim testovima daje veliku osjetljivost.

Kako je vidljivo iz tablice 5. prosječno je bilo potrebno za testiranje DO u HZTM oko 2 sata. Molekularni testovi kojima se testiraju davatelji krvi i DO danas, ID-NAT triplex testovi (HIV RNA, HCV RNA i HBV DNA) traju nešto duže, 5 – 6 sati. Prema podacima iz literature za serološko testiranje je potrebno vrijeme od 6 – 8 sati, a za molekularno 12 – 24 sata, što je kod nas značajno kraće [33]. Prednosti molekularnih testova pred serološkim su veća osjetljivost i mali učinak razrjeđenja na rezultat testa i potvrda zaraze. Nedostatak ovih testova je duže vrijeme testiranja i veća učestalost lažno pozitivnih rezultata ili inhibicija reakcije koja se češće javi u uzorcima donora nekucajućeg srca (donori rožnica) [34, 35].

Rezultate ispitivanja DO u Hrvatskoj treba tumačiti uzimajući u obzir još uvijek mali uzorak što onemogućava stratifikaciju DO prema demografskim i drugim obilježjima značajnim za usporedbu rezultata sa sličnim ili istim populacijama i općom populacijom. Stoga u procjeni infektivnosti i potencijalnog rizika po primatelje organa najboljom se čini usporedba s populacijom novih davatelja krvi kako je prikazano u tablici 6. Zajedničko ovim populacijama je da nisu prethodno testirane i da su isključeni svi s podatkom o zarazi ili rizičnom spolnom ponašanju.

Učestalost zaraza virusom hepatitisa B, C i *T. pallidum* u DO znatno je viša nego u novih davatelja krvi RH (tablica 6). Učestalost HIV-infekcije je niska, gotovo identična. Očekivano učestalost anti-HBc (8,9 %) u populaciji naših DO je viša nego što je u DO Njemačke 1,59 %, Italije 4,96 % ili SAD 3,69 %, a niža za HIV 0,0 % prema 0,10 % i za HCV 1,6 % u odnosu na 3,45 % u američkih ili 4,4 % francuskih DO [36 – 39].

Zaključak

U ovom radu su prikazani rezultati serološkog testiranja donora organa Hrvatske u periodu od 2006. do 2012. godine testiranih u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu. Rezultati upućuju na visoku prevalenciju biljega ubikvitarnih patogena i nisku prevalenciju virusnih infekcija koje se mogu prenijeti prokrvljenim organima i izazvati kroničnu bolest i smrt primatelja.

Od 2013. godine donori organa u Hrvatskoj ispituju se i molekularnim testovima čime se povećala osjetljivost testiranja za HIV, HBV i HCV infekcije u prijeserokonverzijskoj fazi i omogućila detekcija okultne infekcije HBV infekcije. Tijekom ispitivanog perioda primili smo samo jednu sumnju na prijenos zaraze na dva primatelja organa istog donora, i to virusom varicella zoster, što je naknadno potvrđeno ispitivanjem arhivskog uzorka krvi DO, a za koji nije obvezno ispitivanje donora organa. Smatramo da su testovi koje smo odabrali za testiranje donora organa i algoritmi koje smo primijenili u ispitivanju njihovih reaktivnosti, preporuke za osiguranjem kvalitete uzorka koje smo izdali, zajedno s dobrom selekcijom donora u donorskim bolnicama pridonijeli kvaliteti i sigurnosti liječenja bolesnika sa zatajenjem funkcije organa različite etiologije.

Literatura

- [1] Patel R, Paya CV. Infections in Solid-organ Transplant Recipients. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 86–124
- [2] Nalesnik MA, Woodle ES, Dimaio JM, i sur. Donor-Transmitted Malignancies in Organ Transplantation: Assessment of Clinical Risk. *Am J Transplant* 2011; 11: 1140–1147
- [3] Fishman JA. Infection in Solid-Organ Transplant Recipients. *N Engl J Med* 2007; 357: 2601–14

Tablica 6. Usporedba prevalencije biljega HBV, HCV, HIV i sifilisa u donora organa (DO) i novih davatelja krvi (DDK) u Hrvatskoj
Table 6. Comparison of the prevalence of HBV, HCV, HIV and syphilis markers in organ donors (OD) and first time blood donors (FTBD) in Croatia

		Prevalencija potvrđeno pozitivnih (%) / Prevalence of confirmed positives (%)			
		HBV HBsAg	HCV Anti-HCV	HIV Anti-HIV 1/2	Sifilis Anti-TP
DDK/FTBD	2006 – 2012.	0,14	0,07	0,003	0,03
DO/OD	2006 – 2012.	0,50	1,60	0	0,60

- [4] Preiksaitis JK. Guidelines for the prevention and management of infectious complications of solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4(Suppl)10: 51–58
- [5] Weikert B C, Blumberg EA. Viral infection after renal Transplantation: Surveillance and Management. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3: 76–86
- [6] Ison MG, Hager J, Blumberg E, i sur. Donor-derived disease transmission events in USA: data reviewed by OPTN/UNOS Disease transmission Committee. *Am J Transplant* 2009; 9: 1929
- [7] Iwamoto M, Jernigan DB, Guasch A, i sur. Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients. *N Engl J Med* 2003; 348: 2196–2203
- [8] Fischer SA, Graham MB, Kuehnert MJ, i sur. Transmission of lymphocytic choriomeningitis virus by organ transplantation. *N Engl J Med* 2006; 354: 2235
- [9] Norman SP, Kommareddi M, Kaul DR. Update on kidney transplantation in HIV-infected recipients. *AIDS Rev* 2012; 14: 195–207
- [10] Srinivasan A, Burton EC, Kuehnert MJ, Rupprecht C, i sur. Transmission of Rabies Virus from an Organ Donor to Four Transplant Recipients. *N Engl J Med* 2005; 352: 1103–1111
- [11] Zakon o presađivanju ljudskih organa u svrhu lijećenja. NN 144/12
- [12] Pravilnik o mjerama za osiguranje sigurnosti i kvalitete dijelova ljudskog tijela za medicinsku uporabu. NN 143/05, 70/09 i 62/13
- [13] Blumberg EA, Ison MG, Pruett TL, Segev DL, i sur. Optimal testing of the live Organ donor for Blood-Borne Viral Pathogens: The report of Consensus Conference. *Am J Transplant* 2013; 13: 1405–1415
- [14] Fisher SA, Avery RK. Screening of Donor and Recipient Prior to Solid Organ Transplantation *Am J Transplant* 2009; 9 (Suppl 4): S7–S18
- [15] Schafner A. Pretransplant evaluation for Infections in Donors and Recipients of solid Organs. *Clin Infect Dis* 2001; 33 (Suppl.1): S9–S14
- [16] Boyarsky BJ, Hall EC, Singer AL, i sur. Estimating the potential pool of HIV-infected deceased organ donors in the United States. *Am J Transplant* 2011; 11(6): 1209–17
- [17] Guidance for Industry. Eligibility determination for donors of human cells, tissues, and cellular and tissue-based products (HCT/Ps), 2008 <http://www.fda.gov/cber/gdlns/tissdonor.htm>
- [18] Greenwald MA, Kuehnert MJ, Fishman JA. Infectious disease transmission during organ and tissue transplantation. *Emerg Infect Dis* [serial on the Internet]. 2012 Aug. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1808.120277>
- [19] Issa NC, Fishman JA. Infectious Complication of Antilymphocyte Therapies in Solid organ Transplantation. *Clin InfectDis* 2009; 48: 772–786
- [20] Grim SA, Clark NM. Management of Infectious Complications in Solid-Organ Transplant Recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2011; 90: 333–352
- [21] Miller CS. An Evaluation of Total Blood & Plasma Volume Calculations in Eye & Tissue Banking. Abstract of XXV Annual Meeting of European Eye bank Association 2013, p 33; Zagreb, Croatia
- [22] Nadler SB, Hidalgo JU, Bloch T. Prediction of blood volume in normal human adults. *Surgery* 1962; 51: 224–32
- [23] McLeod BC, Weinstein R, Winters JL et al. (eds). *Apheresis Principles and Practice*, 3rd edition. Baltimore: AABB Press, 2010.
- [24] Alfonso RC, Hidalgo R, Paes AT, Zurstrassen VC, i sur. Impact of cumulative risk factors for expanded criteria donors on early survival after liver transplantation. *Transplant Proc* 2008; 40: 800
- [25] Ho JK, Harriga PR, Sherlock CH, i sur. Utilization of liver allograft from a hepatitis B surface antigen positive donors. *Transplantation* 2006; 81: 129
- [26] Otth M, Rödder S, Immer F, Marti H-P. Organ donation in Switzerland: a survey on marginal or extended criteria donors (ECD) from 1998 to 2009. *Swiss Med Wkly* 2011; 141: w13230
- [27] Challine D, Roudot-Thoraval F, Sobotier P, i sur. Serological viral testing of Cadaveric Cornea Donors. *Transplantation* 2006; 82: 788–793
- [28] Padley DJ, Lucas SB, Saldanha J, i sur. Elimination on false-negative hepatitis C virus RNA results by removal of inhibitors in cadaver-organ donor blood specimens. *Transplantation* 2003; 76: 432–434
- [29] Kitchen AD, Gillan HL. The serological screening of deceased tissue donors within the English Blood Service for infectious agents – review of current outcomes and a more effective strategy for the future. *Vox Sanguines* 2010; 98: e193–e200
- [30] Estlund T. Hemodilution due to blood loss and transfusion and reliability of cadaver tissue donor infectious disease testing. *Cell Tissue Bank* 2000; 1: 121–7.
- [31] Stephens G M, Raboud J M, Karakas L, Sherlock CH, i sur. Can Pooling Be Used for Seroprevalence Studies of Hepatitis C. *J Clin Microbiol* 2000; 38 (11) 4264–4265
- [32] Stratta RJ. Organ and Tissue Donor-Transmitted Infection: Improved Prevention Through Better Screening Technologies and Practices. *Medscape*. Dec 16, 2008.
- [33] Humar A, Morris M, Blumberg E, Freeman R, i sur. Nucleic Acid Testing (NAT) of Organ Donors: Is the 'Best' Test the Right Test? A Consensus Conference Report. *Am J Transplant* 2010; 10: 889–899
- [34] Zou S, Dodd R J, Stramer SL, Strong M, i sur. Probability of viremia with HBV, HCV, HIV and HTLV among Tissue Donors in United States. *N Engl J Med* 2004; 351: 751–9
- [35] Strong DM, Nelson K, Pierce M, Stramer SL. Preventing disease transmission by deceased tissue donors by testing blood for viral nucleic acid. *Cell Tissue Bank* 2005; 6: 255–262
- [36] Yu L, Koepsell T, Manhart L, Ioannou G. Survival After Orthotopic Liver Transplantation: The Impact of Antibody Against Hepatitis B Core Antigen in the Donor Liver Transpl Phil. *J Int Med* 2009; 47: 203–206,
- [37] Ellingson K, Seem D, Nowicki M, Strong D, M Kuehnert M J. Estimated Risk of Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus Infection among Potential Organ Donors from 17 Organ Procurement Organizations in the United States. *Am J Transplant* 2011; 11: 1201–1208
- [38] Challine D Pellegrin B, Bouvier-Alias M, Rigot P, i sur. HIV and hepatitis C virus RNA in seronegative organ and tissue donors. *Lancet* 2004; 364: 1611–1612
- [39] Aswad S, Khan NS, Comanor L, Chinchilla C, i sur. Role of nucleic acid testing in cadaver organ donor screening: detection of hepatitis C virus RNA in seropositive and seronegative donors. *J Viral Hepatol* 2005; 12: 627–634