

# DIJAGNOSTIČKI POSTUPCI ZA SKUPINU BOLESTI PRENOSIVIH KRVLJU, S POSEBNIM OSVRTOM NA HIV INFEKCIJU

---

**Bikić, Josipa**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2014**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split / Sveučilište u Splitu**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:162364>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-23**



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija  
SVEUČILIŠTE U SPLITU

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University Department for Health Studies, University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Josipa Bikić**

**DIJAGNOSTIČKI POSTUPCI ZA SKUPINU BOLESTI  
PRENOSIVIH KRVLJU, S POSEBNIM OSVRTOM NA HIV  
INFEKCIJU**

**Završni rad**

Split, 2014.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Josipa Bikić**

**DIJAGNOSTIČKI POSTUPCI ZA SKUPINU BOLESTI  
PRENOSIVIH KRVLJU, S POSEBNIM OSVRTOM NA HIV  
INFEKCIJU**

**Završni rad**

Mentor:

**doc. dr. sc. Ivana Kolčić**

Split, 2014.

SADRŽAJ :

<b>1. UVOD.....</b>	<b>5</b>
1.1. Definicija i podjela bolesti prenosivih krvlju.....	6
1.2. Epidemiologija HIV i hepatitis infekcija u svijetu.....	8
1.2.1. Incidencija i prevalencija krvlju prenosivih bolesti u svijetu.....	9
1.2.1.1. Incidencija i prevalencija HIV infekcije u svijetu.....	9
1.2.1.2. Incidencija i prevalencija hepatitis B i C infekcija u svijetu.....	11
1.2.2. Incidencija i prevalencija HIV infekcije u RH.....	12
1.3. Ubodni incidenti kod zdravstvenih djelatnika.....	14
1.4. Obilježja kliničke slike bolesti prenosivih krvlju.....	16
1.5. Metode prevencije prijenosa uzročnika bolesti prenosivih krvlju.....	18
<b>2. LABORATORIJSKE METODE U DIJAGNOSTIČKIM POSTUPCIMA ZA SKUPINU BOLESTI PRENOSIVIH KRVLJU.....</b>	<b>20</b>
2.1. Opći pregled.....	20
2.2 Serološki dijagnostički postupci.....	22
2.2.1 Serološki profil HBV infekcije.....	24
2.2.2. Serološki profil HCV infekcije.....	26
2.2.3. Serološki profil HIV infekcije.....	27
2.2.4. Laboratorijski testovi.....	28
2.3. Molekularni dijagnostički postupci.....	31
2.3.1. Specifičnosti infekcija na molekularnoj razini.....	32
2.3.2. Laboratorijski testovi .....	33
<b>3. PREDNOSTI I NEDOSTACI LABORATORIJSKIH TESTOVA.....</b>	<b>36</b>
<b>4. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>38</b>
<b>5. SAŽETAK.....</b>	<b>39</b>
<b>6. SAŽETAK NA ENGLISKOM JEZIKU.....</b>	<b>40</b>

<b>7. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>41</b>
<b>8. LITERATURA.....</b>	<b>42</b>

## 1. UVOD

S obzirom da se radi o kompleksnoj skupini bolesti, ovaj rad je osmišljen tako da obradi najučestalije krvlju prenosive bolesti, s posebnim osvrtom na HIV infekciju. Prikazati će se epidemiološke osobine ovih infekcija tj. incidencija, prevalencija i posebnosti samih infekcija preko geografske lokalizacije infekcija, usporedbe oboljelih po spolu, rizičnim čimbenicima i putu prijenosa. S druge strane, rad će prikazati dijagnostičke postupke za identifikaciju HIV i hepatitis B i C infekcija, a panel pretraga se oslanja na serološku i, noviju, molekularnu dijagnostiku. Ove infekcije su dobile posebnu pozornost i u ovom radu jer su toliko učestale da predstavljaju javnozdravstveni problem diljem svijeta pa je nekako potpuno logično sagledati ove velike medicinske probleme sa šireg stajališta i naznačiti kako je u borbi s infekcijama bitna pravovremena i točna dijagnoza koju nudi suvremena medicinsko laboratorijska dijagnostika.

Poseban osvrt na HIV infekciju je predstavljen kroz prikaz statistike za RH, epidemiološke posebnosti i kroz predstavljanje brojnih centara u Hrvatskoj.

## 1.1. Definicija i podjela bolesti prenosivih krvlju

Krvlju prenosive bolesti podrazumijevaju skupinu bolesti uzrokovanih različitim uzročnicima (bakterije, virusi, gljive, paraziti), a zajedničko im je obilježje – prijenos krvlju. Prijenos se ostvaruje uglavnom različitim zahvatima: venepunkcijom, transfuzijom, transplantacijom organa, kirurškim zahvatom, hemodijalizom, tetoviranjem, injekcijama, ali se može ostvariti i vertikalno - s majke na dijete kao i ubodom insekata. Prije svega, u opisu ove skupine bolesti treba napomenuti da je teško govoriti o konkretnom pojmu krvlju prenosivih bolesti jer se svaka od takvih bolesti svrstava u neku drugu skupinu koja joj je karakterističnija. Primjerice HBV je češće percipiran kao spolno prenosiva bolest, nego li kao krvlju prenosiva. Stoga je u ovom radu za potrebe podjele bolesti korištena podjela koju koristi i Centar za kontrolu bolesti iz SAD-a (*Centers for Disease Control and prevention, CDC*) za najčešće infekcije koje se prenose krvnim preparatima (Tablica 1) (1).

Tablica 1. Prikaz najznačajnijih krvlju prenosivih uzročnika i bolesti (1)

<b>Virusi</b>	HIV, HBV, HCV, citomegalovirus, virus Zapadnog Nila; Denga groznica
<b>Bakterije</b>	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>E. coli</i>
<b>Prioni</b>	prijenosna spongiformna encefalopatija, Creutzfeldt – Jakobova bolest
<b>Paraziti</b>	babezioza, Chagasova bolest, lišmenioza, malarija

U kontekstu krvlju prenosivih bolesti se ipak najviše govori o HIV, HBV, HCV infekcijama kao najučestalijima.

HIV infekciju uzrokuje *Human Immunodeficiency virus* koji spada u skupinu retrovirusa i u ljudskom organizmu napada CD-4 + (pozitivne) stanice (limfociti T, monociti, makrofagi, glija stanice, dentritične stanice) i razara ih uzrokujući ozbiljne imunološke poremećaje kao što su limfopenija, leukopenija, trombocitopenija, anemija. Razaranje svih navedenih stanica ujedno predstavlja i razaranje imunološkog sustava osobe pa je osoba podložnija tzv. oportunističkim infekcijama. Infekcija HIV–om može dovesti do AIDS-a (engl. *Acquired Immunodeficiency Syndrome*) koji predstavlja posljednji stadij infekcije. HIV virus je specifičan jer ga organizam ne može odstraniti. Jednom kad ga osoba stekne, ona ima infekciju do kraja života.

Hepatitis B i C virusi su poprilično različite građe, ali je jako zanimljivo da kod osoba izazivaju slične zdravstvene probleme, tj. ciljni organ im je jetra i izazivaju njenu upalu (Tablica 2). Kod obaju virusa uočavamo postojanje različitih genotipova virusa. Hepatitis B ima 8 različitih

genotipova imenovanih od A-H. Postoji cjepivo koje štiti od navedenih genotipova, iako su zabilježeni mutirani tipovi virusa na koje cjepivo nema utjecaja (2). Zbog velike rekombinacije u genomu kod hepatitisa C nema razvitka cjepiva. Prema posljednjoj nomenklaturi imamo 7 genotipova i 67 podtipova (3). Moguće je da osoba bude zaražena i sa više genotipova istovremeno.

*Tablica 2. Osnovne karakteristike HIV-a i hepatitis B i C virusa*

<b>Virus</b>	<b>Porodica</b>	<b>Rod</b>	<b>Genom</b>	<b>Bolest</b>
HIV	<i>Retroviridae</i>	<i>Lentivirus</i>	RNA	imunodeficijencija
HBV	<i>Hepadnaviridae</i>	<i>Orthohepadnavirus</i>	DNA	hepatitis
HCV	<i>Flaviviridae</i>	<i>Hepacivirus</i>	RNA	hepatitis



## 1.2. Epidemiologija HIV i hepatitis infekcija u svijetu

Za nastanak infekcija moraju biti ispunjeni određeni uvjeti. Riječ je o tzv. Vogralikovom lancu: "Neophodan je uzročnik bolesti u dovoljnoj količini; mora postojati izvor bolesti; biti osiguran put prijenosa; uzročnik bolesti mora ući u organizam; osoba mora biti osjetljiva."(4). To je zajedničko svim zaraznim bolestima i ako se ne ispuni bilo koji od uvjeta, manifestacija zarazne bolesti može izostati.

HIV je jako raširen u svijetu. Infekcije su učestalije kod rizičnih skupina kao što su osobe homoseksualce i biseksualne orijentacije, intravenozni korisnici droga i novorođenčad oboljelih žena. "Omjer oboljelih muškaraca i žena je u razvijenim zemljama 4:1, a u nekim afričkim zemljama 1:1."(5). Treba svakako napomenuti da upravo u tim područjima subtropskih afričkih zemalja ova infekcija poprima posebne kliničke i epidemiološke manifestacije. HIV ne može dugo opstati bez ljudskog organizma, prenosi se samo preko određenih tjelesnih tekućina zaražene osobe – krvi, sperme, tekućina rektalnog i vaginalnog područja, mlijeka. Smatra se da je u području zapadne Afrike sličan virus koji napada čimpanze (engl. *Simian Immunodeficiency Virus*, SIV) prešao na čovjeka i mutirao u HIV. To se dogodilo u 19. stoljeću i od tada se infekcija polako proširila i u ostale dijelove svijeta.(6). U Americi je zasigurno već od 70-ih godina prošlog stoljeća.

Hepatitis B je raširen po cijelom svijetu. Dokazana je prisutnost virusa u više tjelesnih tekućina, ali je najzaraznija krv. Prijenos se ipak najčešće ostvaruje spolnim putem, a određeni putovi prijenosa još nisu dokazani, primjerice prijenos zrakom i preko probavnog sustava. Rezervoar zaraze je isključivo čovjek. Virus može opstati izvan organizma čak do 7 dana, a da i dalje bude infektivan. U visoko endemskim područjima najčešći je prijenos s majke na dijete i u djetinjstvu (5).

Hepatitis C se najčešće stječe upravo putem krvi i to korištenjem inficiranih igala, a rjeđe transfuzijom i transplantacijom organa. Drugi načini prijenosa se još uvijek ispituju. Za sada se zna da je spolni put prijenosa rijedak, ali je zabilježen kod osoba koje su ujedno bile zaražene HIV-om. Dok je perinatalni prijenos također moguć, prijenos mlijekom se ne ostvaruje (5).

## 1.2.1. Incidencija i prevalencija krvlju prenosivih bolesti u svijetu

### 1.2.1.1. Incidencija i prevalencija HIV infekcije u svijetu

Po završetku 2013. g. procijenjeno je da 35 milijuna ljudi ima HIV infekciju. Upravo dvije trećine oboljele populacije živi u subsaharskoj Africi gdje se i dalje bilježi porast broja novonastalih infekcija. U 2013. godini zabilježeno je 2,1 milijuna novoinficiranih. Broj umrlih od AIDS-a je 1,5 milijuna prema podacima iz 2013.god. (7). Zahvaljujući djelovanju udruga i medija, svijest o odgovornom ponašanju koje može spriječiti prijenos virusa podiže se i trend pobola se u nekim područjima smanjuje, iako to nije slučaj za sve svjetske regije. “Primjerice, broj novih slučajeva na Bliskom Istoku i u sjevernoj Africi je porastao za više od 35%” (5). Kako je ova infekcija prerasla u veliki javnozdravstveni problem, diljem svijeta 131.000 ustanova omogućava testiranje na HIV. Globalna prevalencija HIV infekcije kod odraslih iznosi u prosjeku 0.8% (8).

*Tablica 3. Prikaz proširenosti HIV infekcije među odraslim osobama u različitim WHO regijama (8)*

WHO regija	Prevalencija (%)
Zapadni Pacifik	0.1
Istočni Mediteran	0.2
Jugoistočna Azija	0.3
Europa	0.4
Amerika	0.5
Afrika	4.6

U Europi je HIV infekcija i dalje veliki problem. Prema posljednjim podacima iz 2012. godine, incidencija HIV infekcije je u porastu. U 53 zemlje, članice europske WHO skupine, zabilježene su 131.202 nove infekcije (9). Ono što posebno zabrinjava stručnjake WHO je kasno postavljena dijagnoza. To ukazuje na lošu svjesnost o ozbiljnosti infekcije i dostupnosti testova.

Evidenciju o dijagnozama najmanje vode zemlje Istočne Europe, dok je u zemljama Europske Unije broj dijagnoza najveći uz spolni put prijenosa kao najčešći (Tablica 4.).

*Tablica.4. Prikaz statističkih podataka vezanih uz HIV infekciju u pojedinim regijama Europe uz prikaz najčešćeg načina prijenosa (9).*

<b>Geografska regija</b>	<b>WHO Europska regija</b>	<b>Zapad</b>	<b>Centar</b>	<b>Istok</b>	<b>EU</b>
Broj država koje vode statistiku	51/53	23/23	15/15	13/15	30/31
Broj HIV dijagnoza	55494	27315	3715	24 464	29 381
Postotak dijagnoza na 100 000 stanovnika	7,8	6,6	1,9	22	5,8
Postotak za dobnu skupinu od 15-24	10,3	9,8	15,4	10,1	10,6
Omjer muškarci-žene	2,1	3,1	4,5	1,4	3,2
<b>Način prijenosa</b>					
Heteroseksualni	45,6%	35,3%	24,6%	60,2%	33,8%
Prijenos spolnim putem među muškarcima	22,8%	41,7%	26,2%	1,2%	40,4%
Intravenozna primjena droge	17,8%	5,1%	7,3%	33,6%	6,1%
Nepoznato	12,3%	17,0%	36,9%	3,2%	18,7%

### 1.2.1.2. Incidencija i prevalencija hepatitis B i C infekcija u svijetu

Na globalnoj razini 240 milijuna ljudi ima kroničnu HBV infekciju (procjena korištena HBs antigena kao markera), a oko 600 000 godišnje umre od bolesti jetre, koja je posljedica učinka HBV-a (10). „Otprilike 45% stanovništva živi u prostorima u kojima je HBV visoko endemski (prevalencija HBV infekcije među odraslima je  $\geq 8\%$ , a riješenih ili kroničnih infekcija je  $>80\%$ .“ (11). U visoko endemskim područjima uočen je višestruk način prijenosa virusa, a infekcije se nerijetko pojavljuju perinatalno i prijenosom među članovima istog kućanstva. Populacije s najvećim brojem kronične HBV infekcije su Istočna Azija, Jugoistočna Azija i Pacifik. Uvođenjem cjepiva incidencija se smanjuje. O tome svjedoče i podaci iz SAD-a. 1985.g. incidencija je bila 11,5 slučajeva na 100 000 stanovnika, a 2006.god. riječ je o samo 1,6/ 100 000. U Hrvatskoj se u periodu od 1990. do 2011.god. incidencija kretala od 3,93 do 1,2 slučaja na 100 000 stanovnika (12).

Prema procjenama WHO 3% stanovništva, tj. otprilike 170 milijuna ljudi ima HCV infekciju. Učestalost HCV infekcije je najveća u Centralnoj i Istočnoj Aziji te u Sjevernoj Africi. Procijenjeno je kako godišnje umre između 350 000 – 500 000 ljudi od komplikacija virusnog hepatitisa C (13). HCV se najčešće prenosi inficiranim iglama pa je u populaciji osoba koje koriste intravenske droge i najučestaliji. Tako je primjerice u Hrvatskoj, prevalencija infekcije HCV-om među narkomanima od 48% - 90% (14).

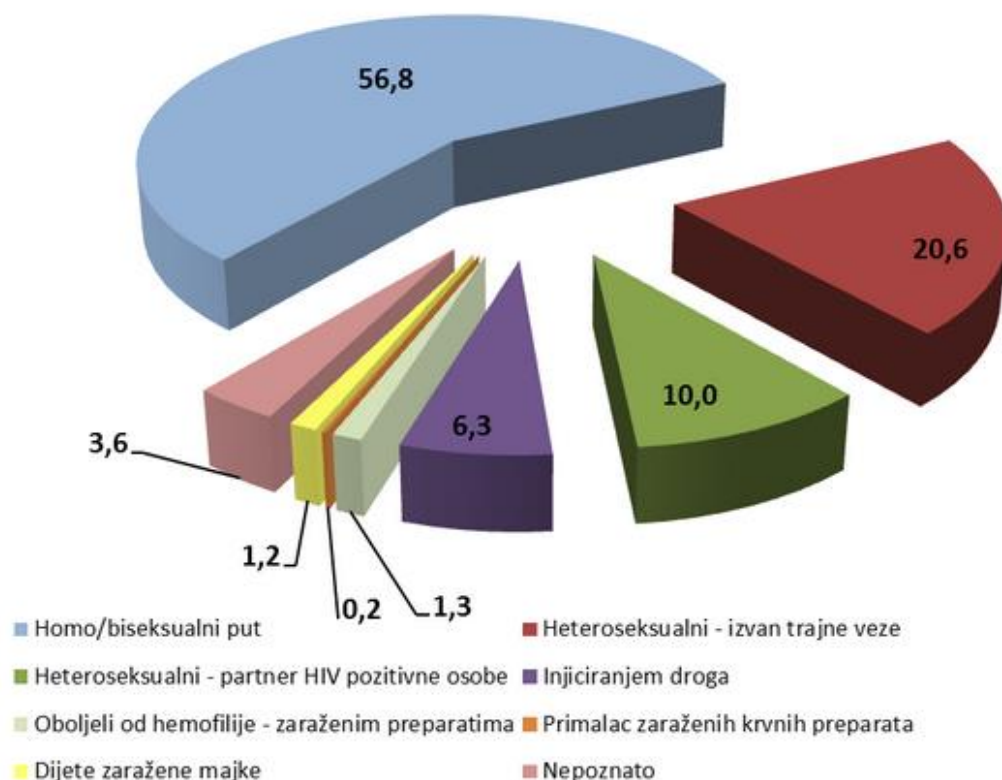
Svakako treba napomenuti da se hepatitis B i C smatraju tihom epidemijom, naročito u europskoj regiji. Svjetska zdravstvena organizacija radi puno po tom pitanju. Radi podizanja svijesti dan 28. srpnja proglašen je Svjetskim danom hepatitisa, a osim toga objavljene su brojne smjernice za prevenciju i kontrolu virusnih hepatitisa.

## 1.2.2. Incidencija i prevalencija HIV infekcije u Republici Hrvatskoj

Iako su hepatitis infekcije češće od infekcije HIV-om u RH, infekcija HIV-om poprima specifična epidemiološka obilježja. Prisutna je niska incidencija u odnosu na visoko rizično ponašanje. Prema posljednjim podacima iz 2012. god. Hrvatska je uz Slovačku zabilježila najnižu incidenciju u Europi.

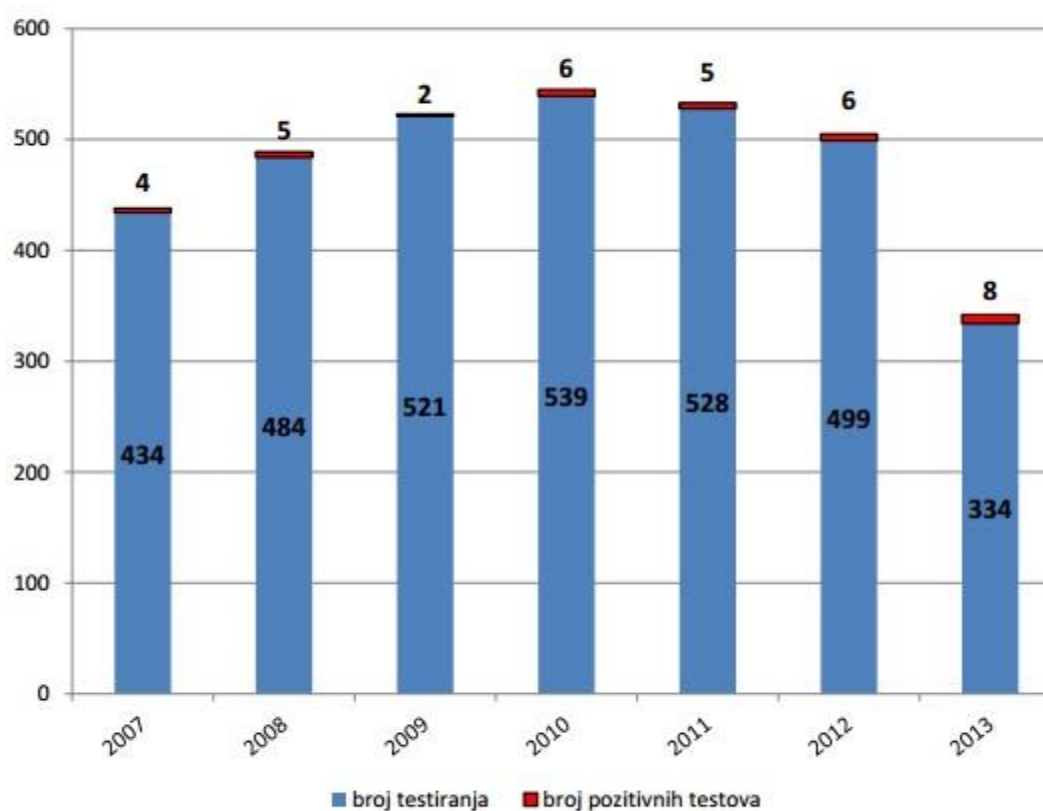
Prema podacima Registra za HIV/AIDS Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, od prvih zabilježenih slučajeva zaraze HIV-om u Hrvatskoj 1985. godine, do kraja 2013. godine ukupno je registrirano 1106 osoba kojima je dijagnosticirana HIV infekcija, od čega je 419 oboljelih od AIDS-a. U navedenom je razdoblju 176 osoba umrla od AIDS-a (15).

Najčešći put prijenosa HIV-a u Hrvatskoj je spolni. (Slika 1). Među osobama koje su se inficirale na taj način nema mladih od 20 godina. Posljednjih godina uočen je i porast broja prijenosa virusa među muškarcima koji imaju spolne odnose sa muškarcima. Prijenos zaraženima iglama nije pokazao trend porasta, kao ni prijenos transfuzijom. Perinatalni prijenos je u svim godinama praćenja bio rijedak i do 2012. imamo zabilježenih inficiranih 11 djece na taj način (16).



Slika.1. Distribucija zaraženih HIV-om (1985-2013. godine) prema vjerojatnom putu prijenosa infekcije (16)

Iako Hrvatska nije veliko žarište infekcije puno se radi na podizanju svijesti i na programima prevencije. Ministarstvo zdravlja je osnovalo 10 HIV savjetovališta gdje se provodi anonimno, dobrovoljno i besplatno savjetovanje i testiranje na HIV. HIV savjetovališta u Hrvatskoj osnivala su se od 2003.-2006. u zavodima za javno zdravstvo u Zagrebu, Puli, Rijeci, Splitu, Zadru, Osijeku, Slavonskom brodu, Dubrovniku i Korčuli, Zatvorskoj bolnici u Zagrebu i u Klinici za infektivne bolesti „Fran Mihaljević“ (17). Ukupno je obavljeno 334 testiranja u 2013.g. (Slika 2) (18). Obilježava se i svjetski dan borbe protiv AIDS-a na datum 1. prosinca.



Slika 2. Broj izvršenih testiranja u centrima za savjetovanje i testiranje na HIV u razdoblju od 2007.g. do 2013. uz prikaz pozitivnih nalaza (18)

### 1.3. Ubodni incidenti kod zdravstvenih djelatnika

Ubodni incidenti ostvaruju se iglom i oštrim predmetima pri čemu uvijek postoji opravdana sumnja da su određeni patogeni iz skupine bolesti prenosivih krvlju uneseni u organizam osobe koja je sudjelovala u incidentu. Najviše prijavljenih incidenata je ipak kod medicinskih sestara, dok se ne smije isključiti i mogućnost da su vjerojatno toliko incidenata imali i doktori, samo incidenti nisu prijavljeni (19). Tako je na primjer, tijekom 29 mjeseci praćenja profesionalnog izlaganja krvi u novoosnovanoj bolnici tercijarne zaštite zabilježena 73 incidenta (Tablica 5) (20). Svakako je važno da se svaki takav incident i prijavi. Pravna procedura tu započinje, a nastavlja se preko bolničkog povjerenstva za kontrolu bolničkih infekcija do povjerenstva za sprječavanje i suzbijanje bolničkih infekcija Ministarstva zdravlja RH u skladu s Pravilnikom o uvjetima i načinu obavljanja mjera za sprječavanje i suzbijanje bolničkih infekcija (NN 93/2002). Treba napomenuti da se ubodni incidenti smatraju ozljedom na radu pa se onda dalje sukladno Pravilniku o pravima, uvjetima i načinu ostvarivanja prava iz obaveznog zdravstvenog osiguranja u slučaju ozljede na radu i profesionalne bolesti (NN br. 1/11), tako i tretiraju.

Tablica.5. Distribucija perkutanih ozljeda tijekom 29 mjeseci provođenja prospektivne studije u novoosnovanoj bolnici tercijarne zdravstvene zaštite (20)

	<i>Žene</i>	<i>Muškarci</i>	<i>Perkutane ozljede kod žena</i>	<i>Perkutane ozljede kod muškaraca</i>
<i>Medicinske sestre</i>	498	117	67	4
<i>Ostalo medicinsko osoblje</i>	58	194	0	0
<i>Administrativno osoblje</i>	376	168	2	0

Teško je govoriti o statistici ubodnih incidenata jer su brojni neprijavljeni iz nebrige ili zbog kompliciranosti pravnog puta. Prema američkim podacima godišnje se zabilježi 385 000 ubodnih incidenata dok je u Hrvatskoj 2011. god. prijavljeno 14 000 ubodnih incidenata (19). Svaki zdravstveni radnik mora biti podvrgnut pre-ekspozicijskoj profilaksi po samom stjecanju posla u zdravstvu, a ukoliko se dogodi ubodni incident, slijedi post-ekspozicijska profilaksa i testiranje uz praćenje situacije.

Pre-ekspozicijska nespecifična profilaksa najvažnija je mjera zaštite. Kod HBV-a postoji čak i specifično cjepivo koje se kod zdravstvenih radnika provodi obavezno. Cjepivo je uvedeno u

obavezni kalendar cijepljenja od 2007.god. Nije se dovoljno jednom cijepiti, pa je uvedena docjepa radi održavanja imune memorije.

Najvažnije je educirati zdravstvene djelatnike o načinima osobne zaštite na radu radi izbjegavanja incidenata i radi pravilnog ponašanja ukoliko se isti dogodi jer za mnoge uzročnike ne postoji specifična zaštita cijepljenjem. Razina rizika za prijenos pojedinih virusa prilikom jednokratnog ubodnog incidenta iglom prikazana je u Tablici 6.

*Tablica 6. Rizik prijenosa virusa nakon ubodnog incidenta iglom (21)*

<b>Virus</b>	<b>Procijenjeni rizik</b>
HBV	6-30 % ; 95%-a učinkovitost zaštite kod cijepljenih (10)
HCV	1,8%
HIV	0,3%



## 1.4. Obilježja kliničke slike bolesti prenosivih krvlju

Obilježja kliničke slike AIDS-a su poprilično nespecifična. Osobe mogu osjećati umor, gubitak težine, znojenje, hipertrofiju limfnih čvorova, upaljeno grlo, povišenu tjelesnu temperaturu, osip. Iako su znakovi nespecifični i ponekad ih osobe osjećaju čak i tek 10 godina nakon infekcije, ako se pojavi nekoliko simptoma istovremeno možemo opravdano posumnjati na HIV infekciju. Bitno je paziti da se osobe upravo prema tim simptomima dalje klasificiraju u 4 skupine, od kojih svaka zahtijeva poseban tretman.

Tablica 7. Kategorije HIV infekcije

1. skupina	akutna primarna infekcija
2. skupina	asimptomatska infekcija
3. skupina	perzistentna generalizirana limfadenopatija
4. skupina	potpuno razvijena bolest

Akutna infekcija nastupa 2-4 tjedna nakon zaraze i dosta nalikuje gripi. U tom periodu se HIV jako puno umnaža, u organizmu domaćina, a CD4+ stanice zaražene osobe stabiliziraju razinu virusa nakon nekog vremena. Asimptomatska infekcija može trajati različito dugo. Ako osoba koristi antiretrovirusnu terapiju onda može živjeti s infekcijom desetljećima bez narušavanja kvalitete života. S vremenom razina CD4+ stanica opada i kada dosegne razinu od 200 st/mm<sup>3</sup> krvi smatra se da osoba ima AIDS (normalni zbroj CD4 stanica je između 500 i 1,600 st/mm<sup>3</sup>. ) (22).

Hepatitis B virus po ulasku u organizam napada jetrene stanice, umnožava se u jezgri, a sazrijeva u endoplazmatskom retikulumu hepatocita. Na taj način hepatociti propadaju i nastupa upala jetre. Infekcija može biti akutna ili kronična, a simptomi mogu i izostati. Inkubacijski period varira između 60 i 150 dana, u prosjeku traje 90 dana. Obilježja kliničke slike su: žutica, mučnina, gubitak teka, povraćanje, abdominalna bol, a mogu se javiti i urtikarija, upala zglobova i glomerulonefritis. U većini slučajeva akutni oblik bolesti završi izlječenjem, ali može prijeći i u perzistentni dobroćudni oblik bolesti ili može prijeći u kronični aktivni hepatitis koji može završiti cirozom jetre ili hepatocelularnim karcinomom. Zdrave odrasle osobe koje steknu infekciju u 90% slučajeva se izliječe i unutar 6 mjeseci potpuno eliminiraju virus iz organizma. Kronični oblik bolesti najčešće razviju zaražena djeca mlađa od 6 godina (Tablica 8) (23).

*Tablica 8. Postotak razvitka akutnog oblika bolesti u kroničnu HBV infekciju, prema podacima američkog Centra za prevenciju i kontrolu bolesti za pojedine dobne skupine (23)*

Novorođenčad	90%
Djeca (1-5 god.)	25- 50 %
Odrasli	5%

Hepatitis C infekcija može biti akutna i kronična. Akutna infekcija u 15% slučajeva spontano bez ikakvog tretmana završi izlječenjem, tj. osoba uspije unutar 6 mjeseci eliminirati virus. U preostalih 85% slučajeva akutna infekcija prelazi u kroničnu. Zanimljivo je da akutna hepatitis C infekcija jako nalikuje već spomenutoj hepatitis B infekciji i kronični oblik obiju bolesti pokazuje moguću progresiju u cirozu i hepatocelularni karcinom. Inkubacija traje od 2 tjedna do 6 mjeseci. Većina infekcija je ipak asimptomatska. Čak 75% ljudi s hepatitisom C uopće i ne zna da je inficirano (24).

## 1.5. Metode prevencije prijenosa uzročnika bolesti prenosivih krvlju

Kao metode prevencije, trebale bi se provoditi mjere pravilne higijene ruku, što osim ispravnog pranja ruku podrazumijeva i korištenje rukavica. Uz to, bitno je pravilno ophođenje sa opremom i otpadom. Sve prethodno navedeno zahtjeva dobru izobrazbu zdravstvenih radnika. Isto tako, zdravstveni sustav bi trebao provoditi mjere profilakse u obliku cijepljenja kad je god to moguće, i to ne samo za zdravstvene radnike, već i za opću populaciju. Kad pričamo o krvlju prenosivim bolestima, ne smijemo ni zaboraviti da je bitno provesti sve moguće mjere prevencije prijenosa patogena preko krvne doze koja je proizvod transfuzijskog rada.

Osim osnovnih mjera opreza, u zaštiti od HIV-a i HBV-a služimo se i nekim specifičnijim rješenjima. Za HIV infekciju imamo antiretrovirusnu profilaksu koja smanjuje vjerojatnost zaraze. Prema normama Centara za kontrolu i prevenciju bolesti u SAD-u je u svibnju 2014. god. proglašen lijek 'Truvada' (TDF/FCT; tenofovir/emtricitabin) primjerenim oralnim sredstvom za prevenciju HIV infekcije. Lijek se propisuje spolnim partnerima osoba zaraženih HIV-om i osobama koje ne koriste zaštitu prilikom spolnog odnosa. Prema istraživanjima, ako se uzima jedna tableta dnevno, kao što je i preporučeno, smanjuje se rizik za više od 90% (25).

HBV ima specifičnu profilaksu tj. specifično cjepivo koje se može primiti prije, ali i ubrzo nakon kontakta s HBV (najbolje unutar 24 sata). HBV cjepivo je uvršteno u kalendar cijepljenja već u djetinjstvu. Može se primiti paralelno s nekim drugim cjepivima. Imunost na HBV koja se stječe cijepljenjem onda ostaje barem 20 godina. Cjepivo se može primiti i u trudnoći i tijekom dojenja, a bitno je da se cijepi novorođenče HBV pozitivne majke unutar 12 sati od rođenja. Cjepivo ne trebaju dobiti osobe koje su pokazale alergijsku preosjetljivost na neki od sastojaka cjepiva. Kod imunokompromitiranih osoba i osoba na hemodijalizi cjepivo se primjenjuje u većim dozama. Cjepivo je pokazalo iznimnu sigurnost i efikasnost. Od 1982. godine preko 1 milijarda doza cjepiva je upotrijebljeno diljem svijeta (23). U Hrvatskoj je HBV u sklopu kalendara kontinuiranog cijepljenja pri čemu je potrebno dijete cijepiti s tri doze cjepiva prema shemi 0-2-6 mjeseci (Slika 3).

NAVRŠENA DOB CJEPIVO	MJESECI				GODINE		RAZRED OSNOVNE ŠKOLE				GODINE	
	0	2	4	6	1	5	I.	VI.	VIII.	19	60	
BCG	■											
Hib**		■	■	■	■							
Di-Te-Per**		■	■	■	■	***						
Polio**		■	■	■	■		■		■			
Di-Te							■		■	■		
Mo-Pa-Ru					■		■					
Hepatitis B*	■	■		■				3x				
ANA-TE												■

\* cijepi se i novorođenčad HBsAg pozitivnih majki odmah po rođenju uz primjenu imunoglobulina prema postekspozicijskoj shemi (NN 164/04)

\*\* Primovakcinacija i prva revakcinacija DTP, polia i H. influenzae, obavljaju se kombiniranim cjevivom (DTaP-IPV-Hib)

\*\*\* samo za djecu koja su propustila primiti drugu DTaP revakcinaciju u dobi od 3 godine prema dosadašnjim Programima

Slika 3. Kalendar kontinuiranog cijepljenja u Hrvatskoj za 2014.g. (26)

Krv kao transfuzijski preparat također prolazi različite faze obrade kako bi se smanjila vjerojatnost prijenosa patogena krvlju. Primarna obrada krvi se sastoji od centrifugiranja i postupka afereze, a sekundarna obrada se sastoji od pranja, filtriranja i zračenja. Upravo ta sekundarna obrada je od ključne važnosti za uklanjanje potencijalnih patogena. Obrada krvnih preparata je zakonom regulirana. Riječ je o Zakonu o krvi i krvnim pripravcima te o Preporukama Vijeća Europe (27).

## **2. LABORATORIJSKE METODE U DIJAGNOSTIČKIM POSTUPCIMA ZA SKUPINU BOLESTI PRENOSIVIH KRVLJU**

### **2.1. Opći pregled**

Standardi dobre laboratorijske prakse nalažu sinkronizaciju rada na razini laboratorijskog osoblja, opreme, materijala i reagensa te dokumentacije. Ako laboratorijski posao funkcionira na svim navedenim razinama, možemo sa sigurnošću reći da je proizvod tog posla (rezultat tj. nalaz) kvalitetan i točan. Danas se pretrage većinom rade automatski, u seriji, uz pridržavanje uputa proizvođača vezano uz korištenje reagensa i kalibraciju aparata (testiranje kontrolnih uzoraka poznatog rezultata).

Kod krvlju prenosivih bolesti testiranje se može provoditi u transfuzijskoj, molekularnoj, imunološkoj i mikrobiološkoj laboratorijskoj djelatnosti. Pri tome treba napomenuti da je transfuzijska djelatnost posebno zakonski regulirana i provodi testiranje na navedene infekcije kod svih svojih uzoraka. Zakonom je obavezno (dobrovoljne darivatelje krvi) testirati na markere HIV-a, HBV-a, HCV-a i sifilisa.

Ukupna dijagnostika se naslanja na laboratorijsku dijagnostiku, naravno uz prethodni liječnički pregled kako bi se uopće posumnjalo na navedene infekcije i kako bi se naposljetku primjećeni simptomi uklopili u kliničku sliku. Pri tom treba napomenuti da postoje laboratorijski pregledi koji neće direktno dokazati uzročnike od interesa, ali će nas navesti na zaključak da se te infekcije zbivaju u organizmu. To se posebno događa kod hepatitisa.

Kad se posumnja na jetreno oštećenje radi se panel standardnih pretraga: AST, ALT, ALP, ukupni i konjugirani bilirubin, ukupni proteini i albumin. Te pretrage omogućuju razlikovanje hepatocelularnog oštećenja od kolestaze (AST, ALT, ALP), akutnog od kroničnog oštećenja (albumin)“ (28). Ukupni proteini pokazat će oštećenu sintetsku moć jetre, a bilirubin moguću progresiju oštećenja jetre do žutice.

*Tablica.9. Povišene vrijednosti jetrenih funkcija u akutnom i kroničnom virusnom hepatitisu u odnosu na referentni interval. U kolestatskom oštećenju povećanja su puno veća (28).*

	Akutni hepatitis	Kronični hepatitis
AST, ALT	> 8-50 x	> 2-5 x
ALP	blago povišenje	unutar referentnog intervala

Osim biokemijskih parametara, po morfološkim promjenama eritrocita u krvnom razmazu može se zaključiti o jetrenom oštećenju.

Što se tiče HIV infekcije, kompletna krvna slika će nas uputiti na postojanje ozbiljnog problema. Često je prisutna anemija uz još upečatljiviji nizak broj leukocita zbog oslabljenosti imunološkog sustava.

## 2.2. Serološki dijagnostički postupci

Za serološke pretrage potreban je serum tj. krvna plazma bez fibrinogena. Zbog toga se poslije uzorkovanja krv ostavi na sobnoj temperaturi da se odvije spontano zgrušavanje koje podrazumijeva u konačnici i potrošnju fibrinogena. Uzorkovanje se vrši u biokemijske epruvete koje nemaju antikoagulans pa je proces tog spontanog stvaranja koaguluma omogućen (Slika 4). Serum se na +4 °C može čuvati 24 h ili na -20 °C nekoliko mjeseci. Kako bismo dobili krvni serum potrebno je punu krv centrifugirati (4000 okretaja, 15 min). Puna krv ne smije se pohraniti u hladnjak kako ne bi nastala hemoliza (raspadanje eritrocita).



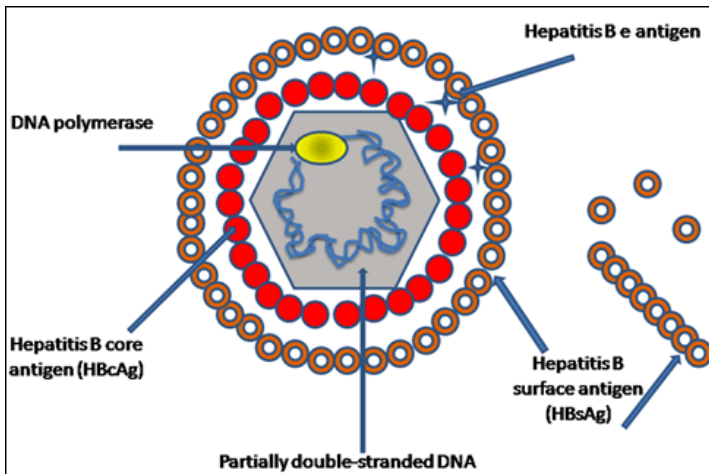
*Slika 4. Biokemijske epruvete bez antikoagulansa. Epruveta sa žutim čepom sadržava separacijski gel koji odjeljuje serum od stanica, a epruveta sa crvenim čepom nema dodatak ili sadrži aktivator koagulacije (29).*

Serološka dijagnostika zaključke donosi na temelju parnih seruma. Prvi serum se u idealnom slučaju uzorkuje, u 1. tjednu infekcije, a drugi serum tjedan do dva nakon prvog. Ovisno o tipu infekcije, periodi se mogu mijenjati, ali su uvijek potrebna 2 seruma.

Očekivani rezultati: kod praćenja titra antitijela su: serokonverzija, obrnuta serokonverzija, pad ili porast titra (klinički značajan pad ili porast titra za 4 puta ili više), a kod

antigena je kvalitativni rezultat (+/-). Serokonverzija predstavlja promjenu negativnog rezultata u pozitivni, a obrnuta serokonverzija obrnutu situaciju. Dakle, u oba slučaja, jedan od seruma ima pozitivan titar, a u jednom uzorku nema stvorenih antitijela.

Za shvaćanje seroloških testova potrebno je upoznati građu ovih virusa i primijetiti kako su se njihova obilježja iskoristila u svrhu dijagnostike.

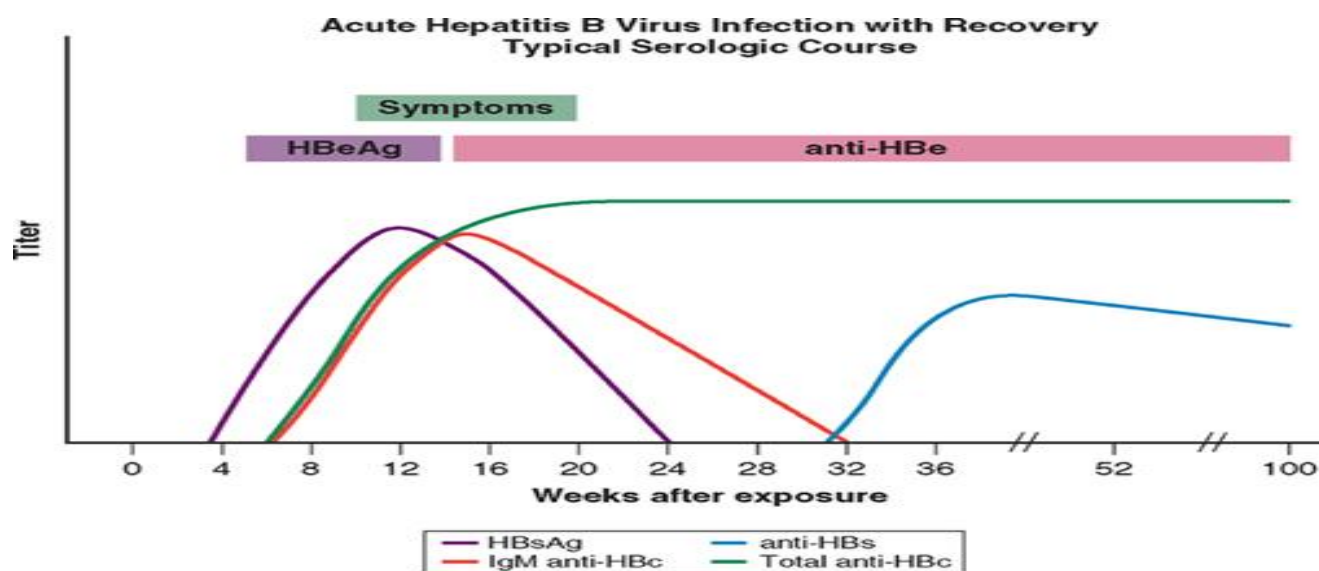


Slika 5. Građa HBV-a (30).

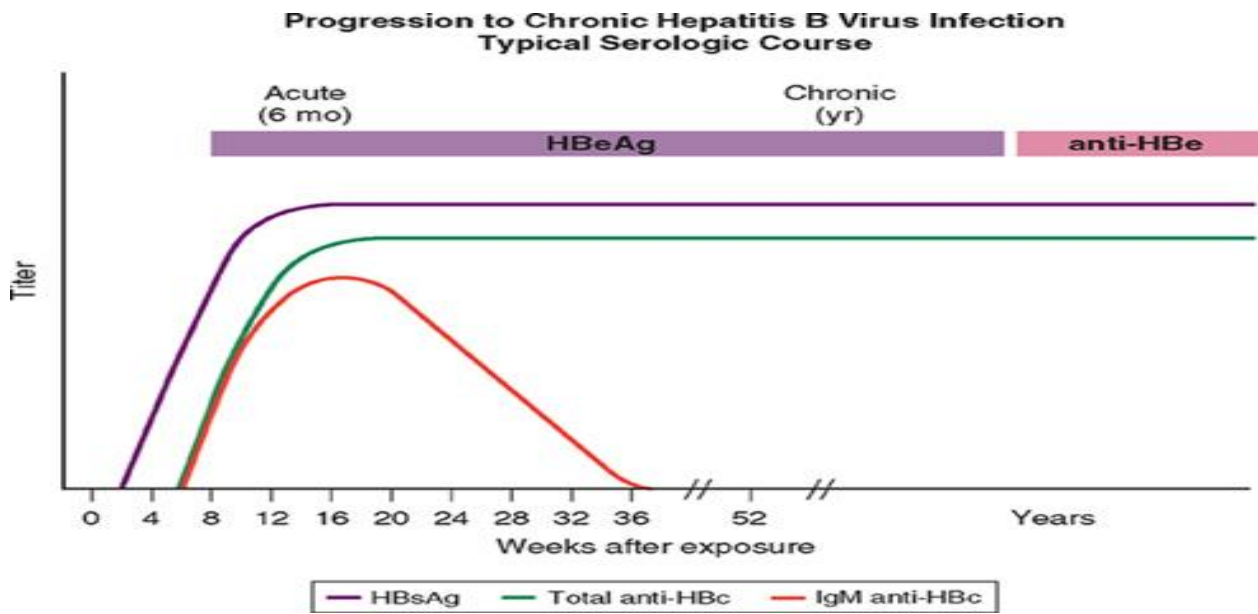


## 2.2.1 Serološki profil HBV infekcije

HBV ima DNA genom uz koji se nalaze i specifični antigeni: HBs Ag (s=*surface*), HBc Ag (c=*core*) i Hbe Ag (e=*envelope*) (Slika5). Serološki testovi ne mogu detektirati HBeAg, ali ostale mogu. To su antigeni s kojima organizam zaraženog dođe u kontakt pa kao odgovor stvara antitijela (anti-HBs, anti-HBc, anti- HBe). Sva antitijela možemo detektirati serološkim testovima uz napomenu da anti-HBc mogu biti IgM i IgG pa nam je to pouzdan marker akutne odnosno kronične infekcije. HBsAg je znak prisustva infekcije i organizam obično eliminira antigena za 2-3 tjedna, a postojanje protutijela predstavlja aktivno preboljenje infekcije. HBeAg znak je aktivne replikacije virusa, a postojanje antitijela označava prestanak replikacije, tj. nisko infektivnu infekciju. HBe antigen možemo naći i u akutnom i u kroničnom hepatitisu. Ukupna protutijela anti-HBc ostaju doživotno i znak su preboljele infekcije. Kod kroničnog oblika infekcije HBsAg, HBV DNA i ukupna anti- HBc antitijela su trajna. Kod određenog postotka zaraženih jedini pozitivni marker je anti HBc, jer se ostali markeri ne mogu detektirati klasičnim serološkim testovima (31). Na Slici 6. prikazan je tipičan tijek infekcije HBV-om i serološki pokazatelji imunološkog odgovora u slučaju izlječenja. S druge strane, Slika 7. predstavlja serološki profil uslijed progresije u kronični hepatitis.



Slika 6. Tipičan tijek infekcije HBV-om i serološki pokazatelji u slučaju izlječenja (32)

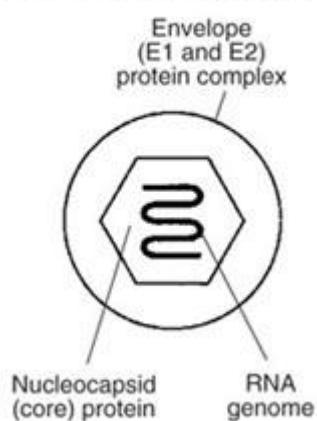


*Slika 7. Tipičan tijek infekcije HBV-om i serološki pokazatelji progresije u kronični hepatitis (33)*

## 2.2.2. Serološki profil HCV infekcije

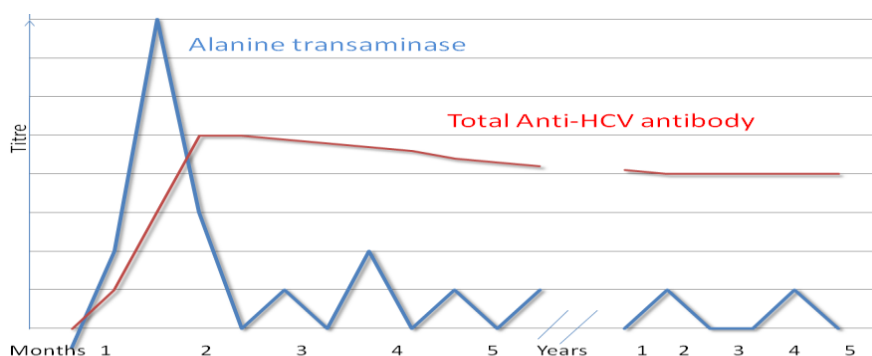
Pouzdan serološki marker su antitijela na HCV Ag. Međutim to je ipak tek test probira. Molekularna dijagnostika predstavlja zlatni standard za detekciju i praćenje HCV infekcije. Nakon 7 tjedana pojavljuju se anti-HCV antitijela i ostaju doživotno (Slika 9). Ona nisu pokazatelj aktivne, preboljele ni kronične infekcije, pa se oslanjamo na razine ALT-a i HCV RNA. To je test prisutnosti hepatitis C virusa, a za sve ostale klinički važne informacije oslanjamo se na već spomenute testove (34).

### HCV Viral Components



Slika 8. Građa HCV-a (35)

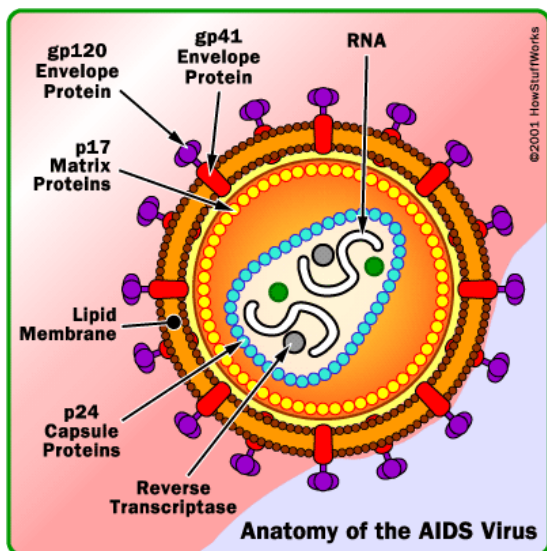
Tijek hepatitisa se može pratiti klinički i preko rezultata jetrenih proba što je i prikazano na Slici 9. Razina alanin transaminaze pouzdan je parametar za procjenu jetrene funkcije.



Slika 9. Tijek HCV infekcije. Razina ALT-a i anti-HCV At u akutnoj i kroničnoj infekciji (36)

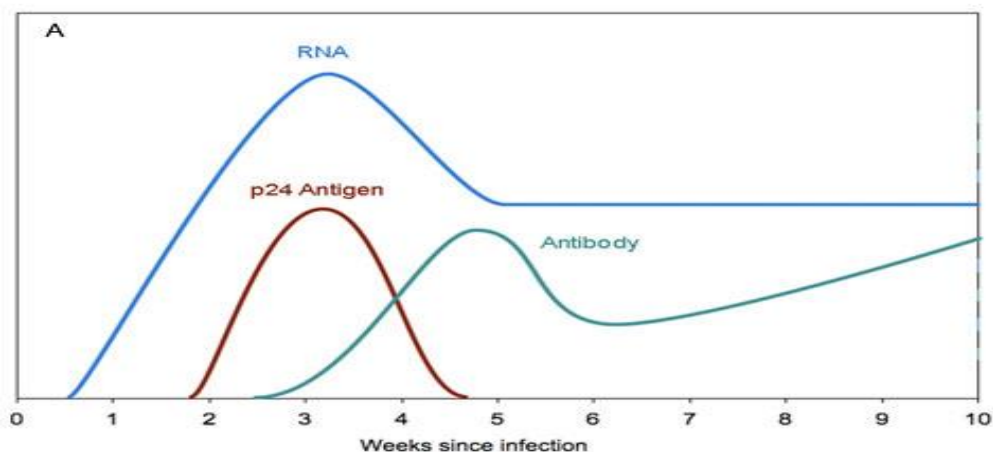
### 2.2.3. Serološki profil HIV infekcije

Kod HIV infekcije serološki markeri su anti-HIV 1, anti-HIV 2 i p24 core Ag. Većina HIV infekcija uzrokovana je sa HIV – 1. Radi identifikacije spomenutih markera infekcije potrebno je provesti test probira (engl. *enzyme immunoassay*, EIA) i ukoliko je on pozitivan onda i potvrdne testove (indirektna imunofluorescenca – IFA te molekularni testovi: Western blot i HIV RNA). Ne smijemo zaboraviti da se kod zaraženih prati razina CD4+ i CD8+ stanica protočnom citometrijom. (37)



Slika 10. Građa HIV virusa (38).

P24Ag je rani marker infekcije, detektiramo ga unutar 10 dana od infekcije. Nastala protutijela detektirati možemo kasnije, i ona ostaju godinama (Slika 11).



**Figure 1A:** Schematic representation of the timing of the appearance of biological markers of HIV infection.

Note: The curve for proviral DNA would be similar to that of viral RNA.

Slika 11. Tijek HIV infekcije (39).

## 2.2.4. Laboratorijski testovi

Tablica 10. Serološki markeri hepatitis infekcije:

	akutna faza	kronična faza
<b>hepatitis B</b>	HBs Ag IgM anti-HBc At	HBs Ag (po potrebi i dr. testovi)
<b>hepatitis C</b>	nema markera akutne faze	Anti HCV

Tablica 11. Serološki markeri HIV infekcije:

<b>HIV infekcija</b>	anti HIV -1 At, anti HIV – 2 At; p24 Ag
----------------------	---

Ove serološke markere pouzdano dokazujemo imunoenzimskim testovima (ELISA, EIA) i imunofluorescentnim testom (IFA).

ELISA test (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) koristi se za praćenje epidemija, za dokazivanje antigena, ali i antitijela za razne infekcije. ELISA test služi za dijagnozu bolesti poput HIV infekcije i SARS-a, ali je ujedno primjenu našla u detekciji GMO organizama, markera trudnoće, sredstava ovisnosti i za detekciju uzročnika u vodi, hrani, zraku. Kao i svaka serološka metoda, zasniva se na antigen-antitijelo reakciji. Test ima nekoliko varijanti, ovisno o tome što dokazujemo. Za izvođenje testa potrebno je: antigen, primarno i sekundarno antitijelo, enzim – supstrat kompleks, pufer, deterdžent (za sprječavanje nespecifičnog vezanja), pozitivna i negativna kontrola i, naravno, polistirenska mikrotitar pločica na kojoj se odvijaju reakcije. Komercijalna protutijela izolirana su iz životinja, na primjer iz kokoši, koze i zeca. Kao rezultat možemo kvalitativno ocijeniti postojanje reakcije, ovisno je li došlo do obojenja, dok se kvantitativno očitavanje reakcije može procijeniti i instrumentalno. Mjeri se apsorbancija svih jažica mikrotitar pločice na specifičnoj valnoj duljini (40).

Postoji puno varijanti testa, a dolje opisani se ipak najviše koriste u rutini. Najčešće korišteni obilježivači su peroksidaza i alkalna fosfataza.

Na Slici 12. imamo prikaz *sandwich* ELISE na mikrotitar pločici se nalaze imobilizirana primarna protutijela, pa dodajemo uzorak pacijenta. Ako pacijent ima u serumu antigene od interesa, oni će se vezati za primarna protutijela. Važno je isprati nevezane antigene. Vizualizirat

ćemo reakciju dodatkom sekundarnog antitijela koje je obilježeno enzimom koji će razgradnjom supstrata dati kromogeni produkt tj. obojenje koje očitavamo kao pozitivnu reakciju.



Slika 12. Detekcija antigena radi se direktnim ELISA testom.

Kod indirektnog ELISA testa imobiliziran je komercijalni antigen, a ako je antitijelo prisutno u serumu pacijenta ono će se vezati za antigene u mikrotitar pločici. Vizualizirat ćemo pacijentovo protutijelo dodatkom sekundarnog (antihumanog) protutijela obilježenog enzimom (Slika13).



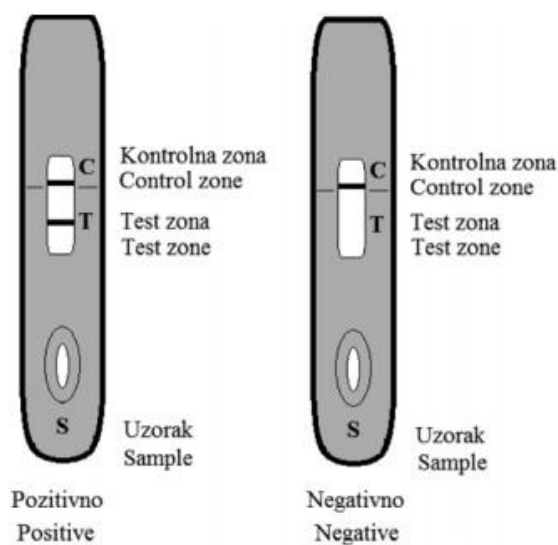
Slika 13. Detekcija antitijela radi se indirektnim ELISA testom.

Indirektni imunofluorescentni test (IFA) služi kao potvrda pozitivnog ELISA testa. IFA je bazirana na istom principu samo se kao detekcijsko sredstvo koristi fluorescentno konjugirano antitijelo. U rutini se koristi indirektni imunofluorescentni test (IFA). Tim testom uspješno dokazujemo antitijela i njihovu lokalizaciju. Lokacija fluorescencije se može vidjeti s fluorescentnim mikroskopom. Komponente testa su: slajdovi s imobiliziranim antigenima, fluoresceinom obilježeni anti-imunoglobulin (IgG), pufer (lužnatog pH radi boljeg poticanja fluorescencije) wash (za ispiranje nevezanog konjugata), kontrole. Procedura testa: na slajdove

nanesemo serume (kontrole i uzorke). Nakon inkubacije slijedi ispiranje tj. odstranjivanje antitijela iz seruma koji se nisu vezali za antigene na slajdovima. Dodajemo konjugat (anti-imunoglobulin obilježen fluoresceinom) i inkubiramo. Anti-IgG antitijela se vežu na antitijela iz pacijentova seruma, odvijanje te reakcije proporcionalno je razini fluorescencije. Slijedi ispiranje i dodavanje pufera, a potom i očitavanje rezultata.

Slajdovi s antigenima bi se trebali čuvati na niskim temperaturama, najbolje na  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ali može i na  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . To su fiksirani razrijeđeni antigeni virusa. Fluorescentni obilježivač je najčešće fluorescein izotiocijanat – FITC (41).

Osim spomenutih testova, suvremena dijagnostika teži razvitku *point-of-care* (POCT) testova. To su testovi koji se izvode uz pacijenta, van laboratorija. Sami početak dijagnostike je krenuo od takvih testova, ali takva dijagnostika tek sad dobiva pravi značaj. Glavni cilj je osigurati brzi, točan rezultat kako bi se što prije pomoglo pacijentu. Razvijena su dva tipa takvih analizatora: mali stolni analizatori (npr. uređaj za acido–bazni status) i mali prijenosni uređaji za jednu svrhu (npr. glukometar). U infektologiji, testovi ovog tipa su već razvijeni i u velikoj su upotrebi. Njihovo pravilno korištenje vodi ka bržoj dijagnozi i boljoj terapiji. Svakako, testovi se iskorištavaju i u svrhe probira i procjene epidemiološkog kretanja infekcija. U ovom području dijagnostike, korišteni POC testovi rade na imunokromatografskom principu. Reakcija se temelji na vezanju antigena iz tekućeg uzorka sa antitijelom adsorbiranim na površini nitrocelulozne membrane u obliku crte (Slika 14) (42).



Slika 14. Prikaz mogućih rezultata brzog imunokromatografskog testa (43)

## 2.3. Molekularna dijagnostika

Molekularna dijagnostika se razvila naglo proteklih 10 - 15 godina, a svoje mjesto je pronašla i u identifikaciji mikroorganizama iz nekoliko razloga. Postoje mikroorganizmi koje je teško kultivirati, mikroorganizmi za koje klasična mikrobiologija nije razvila tako specifične i pouzdane testove, ili je pak riječ o materijalima koji u velikom broju dolaze na identifikaciju. U rutini se provodi radi potvrde viremije i kod probira donacija krvi. Prije ikakvih molekularnih testova potrebno je napraviti izolaciju genoma mikroorganizma. Izolacija je slična onoj kod tretiranja ljudskih stanica samo je potrebno dodatno obratiti pozornost na nekoliko stvari. Postupak liziranja stanica radi oslobađanja genetske tvari kod mikroorganizama je puno rigorozniji, sami uzorak je potrebno centrifugirati i potrebno je u obradi uzorka otkloniti sve inhibitore enzima koji se koriste u laboratorijskom testu. Kod obrade pune krvi bitno je otkloniti hemoglobin i sve metaboličke oblike hemoglobina jer su inhibitori DNA polimeraze. Izvor DNA i RNA virusa su leukociti, točnije limfociti koji su ciljne stanice virusima. Molekularnim testovima dokazujemo i genom HIV, HBV i HCV virusa, pri čemu HBV ima DNA genom, a ostala dva virusa su RNA virusi. Kvalitativni molekularni testovi provode se radi potvrde infekcije i prilikom obaveznog testiranja krvi dobrovoljnih darivatelja, dok se kvantitativni testovi koriste kod praćenja antivirusne terapije. Kvalitativni testovi potvrđuju, odnosno negiraju prisutnost infekcije. Kvalitativni test koji se najviše koristi je PCR, a zbog postojanja brojnih varijanti tog testa, imamo i kvantitativne informacije kao rezultat tog testa. "Kvantitativni PCR mjeri količinu virusa u krvi, a iskazuje se brojem kopija virusa u 1 ml krvi ili internacionalnim jedinicama u 1 ml krvi (IU /ml)" (44). Među kvalitativne testove spada i samo sekvencioniranje genoma koje se u ovom slučaju koristi kod određivanja rezistencije na antimikrobne lijekove. Kvalitativno NAAT testiranje (engl. *nucleic acid amplification testing*) predstavlja kvalitativni PCR (engl. *polymerase chain reaction*) i TMA (engl. *transcription-mediated amplification*). Kod kroničnih oblika bolesti, kad je viremija niska, poželjno je ponoviti NAAT testiranje unutar 6 - 12 mjeseci. Uz amplifikacijske metode, kod HIV infekcije primjenjuje se i hibridizacijska *Western blot* tehnika (45).



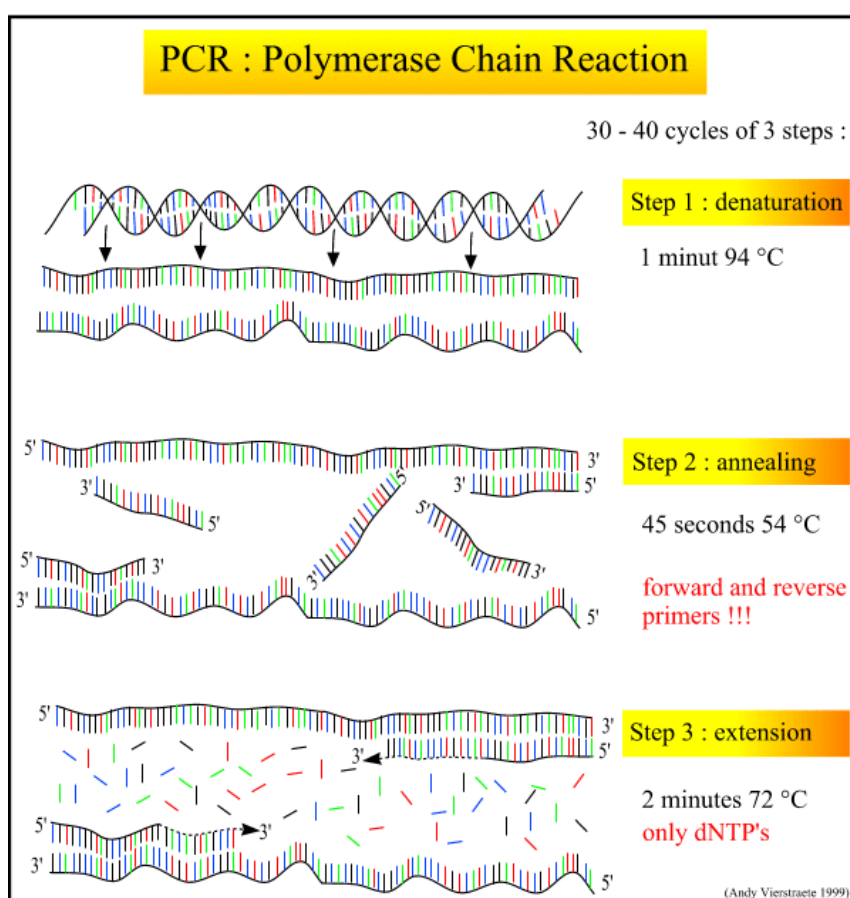
### 2.3. 2. Specifičnosti infekcija na molekularnoj razini

HIV virus je retrovirus, što znači da on preko reverzne transkriptaze ostvaruje prijepis virusne RNA (koju posjeduje) u DNA. Zahvaljujući molekularnim metodama utvrđeno je da postoje HIV-1 i HIV-2 virus i veća patogenost je uočena kod 1. tipa. HIV virus je sklon rekombinacijama u genomu. Detektiramo ga NAAT testom. Western blotting je molekularna metoda kojom se potvrđuje specifičnost razvijenih antitijela, tj. onih koji su bili pozitivni u serološkom testu. Kod djece koja od majki dobiju IgG, i kod osoba za koje se smatra da su u periodu inkubacije, može se mjeriti razina HIV p24 antigena. Molekularne metode se ipak najviše primjenjuju u praćenju terapije.

Kod hepatitisa B detekcija PCR-om je još uvijek metoda izbora, ali nije obavezna. Kod HCV infekcije, molekularni testovi su od veće primjene. Dijagnostika te infekcije je posebno zanimljiva. Genom HCV-a sadrži približno 9500 nukleotida, s 5'- i 3'- nekodirajućim regijama (14). Virus je sklon mutiranju prilikom replikacije pa zato postoji 6 HCV tipova uz postojanje podtipova. Zajedničko svim ti kombinacijama genoma je 340 nukleotida na 5' kraju i upravo se na taj zajednički slijed koncentriraju komercijalni testovi, odnosno taj slijed služi za identifikaciju vrste. Za analizu HCV genoma koristi se najviše RT-PCR, a u novije vrijeme i TMA. NAT testiranje donora krvi na HCV RNA je dovelo do dramatičnog pada incidencije posttransfuzijskog hepatitisa sa padom rizikom stjecanja HCV-a sa 1: 276 000 donacija na 1: 2 milijuna donacija (46). Sekvencioniranjem možemo klasificirati HCV genome, pratiti njihovu geografsku rasprostranjenost i učestalost, pa tako dobivamo uvid u virusnu replikaciju, tijek bolesti i potencijalni razvitak cjepiva. Glavne klase su označe arapskim brojkama od 1 do 6, a podtipovi malim slovima (na primjer a,b,c...), a za samu klasifikaciju odabrane su dvije karakteristične regije u genomu: 5' nekodirajuća regija i NS-5 regija.

### 2.3.1. Laboratorijski testovi

PCR metoda je *in vitro* imitacija DNA sinteze u svrhu višestrukog umnažanja DNA od interesa radi identifikacije. DNA polimeraza predstavlja ključni enzim za proces replikacije i ta se činjenica iskoristila u ovom testu. Za sveukupno laboratorijsko izvođenje testa potrebna nam je DNA od interesa, početnice, puferi (radi održavanja pH vrijednosti bitne za aktivnost enzima), nukleotidi koji će poslužiti za stvaranje novog dugog lanca i, naravno, polimeraza koja je termostabilna, izolirana iz bakterije *Thermus aquaticus* koja je aktivna na visokim temperaturama, kao što su temperature geizira u kojima ova bakterija obitava. Proces PCR-a prikazan je na Slici 15 i Slici 16.



Slika 15. PCR ciklus. Denaturacija se odvija na 94 stupnja. Na temperaturi od 54, primeri i polimeraza se vežu za DNA. Na temp. od 72 stupnja (idealna temp za djelovanje polimeraze) započinje produžetak lanca. Polimeraza dodaje dNTP-ove iz 5' kraja prema 3' kraju.(47)

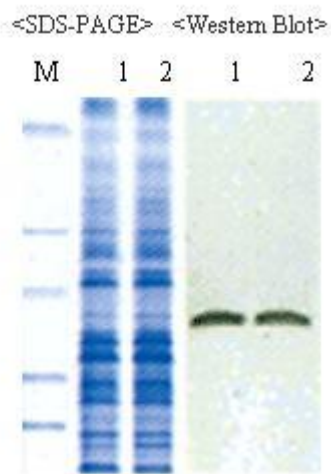
PCR Cycles	Target Copies
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1024
15	32,768
20	1,048,576
25	33,554,432
30	1,073,741,842

Slika 16. Eksponencijalni rast umnoženih kopija DNA u procesu PCR-a (44)

TMA (Transcription mediated amplification) je amplifikacijski test koji stvara RNA amplifikate. Za reakciju su potrebna dva enzima: reverzna transkriptaza i RNA-za. Svaki dio procesa se odvija na istoj temperaturi pa je proces izotermalan. Unutar sat vremena nastaju bilijuni amplifikata. Sve se odvija u jednoj tubi, i u procesu nije potrebno ispiranje, pa je mogućnost kontaminacije svedena na minimum. U prvom koraku je potrebno stvoriti cDNA (*engl. copy DNA*) koja je komplementarna RNA koju imamo u uzorku. Sinteza se odvija zahvaljujući reverznoj transkriptazi koja produžuje primer koji se veže promotorom za RNA. RNA – DNA hibrid se potom lizira korištenjem RNA-ze, a ss-DNA (*engl. single stranded*) se komplementarnim primerom potom pretvara u dvostruku DNA (45).

*Western blotting* (Western upijač) je još jedna genetička metoda koja je našla primjenu za detekciju posebice HIV i HCV infekcije.. Potrebno je prvo lizirati stanicu/tkivo da se oslobodi željeni proteinski sadržaj. Sadržaj se centrifugira i odvojimo supernatant koji sadrži proteine. Nakon toga proteini se razdvajaju na elektroforetskom gelu prema veličini. Korištenjem struje lako se i proteini od interesa prenesu (upiju) na membranu jer je ona obložena primarnim protutijelom koja su specifična upravo za te proteine. Detekcija se odvija sekundarnim antitijelom koje je obilježeno enzimom koje pak onda stvara efekt isti kao i u ELISA testu. Detektiramo osvjetljenje i donosimo zaključke o proteinu. Svako se osvjetljenje uspoređuje s *ladder* (ljestvica), a to je prvotni marker

proteina poznate veličine. Na gelu je to obično prvi stupac, tj. niz svijetlih linija s kojima onda uspoređujemo dobivene rezultate (Slika 17). U detekcijskom sustavu se koriste monoklona mišja protutijela ili poliklona zečja protutijela. Monoklona su specifičnija, ali poliklona imaju više veznih mjesta (48).



*Slika 17. Svi proteini razdvojeni na gelu (SDS PAGE) nisu bili od interesa. Vidimo da na membrani imamo vizualizirane samo neke proteine (49)*

Molekularna dijagnostika ima puno prostora za razvitak. Samo uvođenje sekvencioniranja u rutinski laboratorijski rad dovest će do revolucije u dijagnostici, ali i terapiji infekcija. Zlatni standard tj. sekvencioniranje za sada je ipak prisutno u pojedinim istraživačkim laboratorijima, i u sklopu ovih infekcija izvođenje tog testa ponudilo je jedan potpuno novi pogled na situaciju. Znanstvenici su uočili rekombinacije genoma i njihovu različitu i specifičnu geografsku raspodijeljenost, čime je olakšan pristup razumijevanja i rješavanja infekcija.

## 2.4. Prednosti i nedostaci laboratorijskih testova

Serološka testiranja su u velikoj upotrebi, tj. brojna područja medicinsko-laboratorijske djelatnosti ih izvode. U najvećoj je upotrebi ELISA test zbog visoke osjetljivosti i specifičnosti. Enzimi osiguravaju osjetljivost jer i mala količina enzima će stvoriti vidljivo obojenje. Selektivnost antigena i antitijela osiguravaju specifičnost jer je sama reakcija zasnovana na visokoj komplementarnosti veznih mjesta (antigenskog epitopa i paratopa antitijela). Specifičnost pospješuju i ispiranja koja se u toku testa izvode više puta. Direktna ELISA ima manje koraka, ali pojedinačno obilježavanje svakog antitijela je skupo i zahtjeva puno vremena.(50) Najveći nedostatak testa je svakako određeni postotak lažno pozitivnih i lažno negativnih testova, što ne mora biti nužno zbog grešaka u izvođenju testa. Primjerice kod HIV infekcije, lažno pozitivni rezultati se mogu javiti kao posljedica kontaminacije, a lažno negativni kod preranog testiranja ili kod uznapredovale imunodeficijencije (40).

IFA test je poprilično jednostavan i pouzdan, ali za njegovo očitavanje je potreban fluorescentni mikroskop koji je skup. Uz to, rezultat je donesen na temelju subjektivne procjene i nije kvantitativan (51).

Najveći pomak u dijagnostici postiglo se brzim i pouzdanim *point-of-care* testiranjima koja su se i razvila zbog globalnog problema infektivnih i kardiovaskularnih bolesti. Od spomenutih infekcija, najviše se koristi kod HIV infekcije. Važna prednost takvih testova jest da ih mogu obavljati i osobe bez opsežne tehnološke naobrazbe. Uz to, ovakvim uređajima je omogućeno i samotestiranje. I naravno, moramo spomenuti ekonomičnost uređaja u ovim vremenima kada je cijena često prepreka do razvitka idealnih testova u laboratorijskom poslu. Testovi doprinose brzom dijagnozi, ali podliježu subjektivnoj procjeni što im je glavni nedostatak. Osim toga, pokazuju slabiju osjetljivost i namijenjeni su pojedinačnom testiranju, tj. nema istovremenog testiranja više uzoraka (42).

Molekularna testiranja su još uvijek poprilično skupa i pokazala su veliki postotak lažno pozitivnih rezultata. Zlatni standard je sekvencioniranje koje još nije uvedeno u rutinski rad, ali molekularna testiranja sveukupno nude novi pogled na infekcije što rezultira u konačnici boljom i specifičnijom terapijom.

Najveći nedostatak svih spomenutih testiranja leži u samoj prirodi ovih infekcija. Naime, postojanje dijagnostičkog prozora otežava sigurnu dijagnozu. *Window period* predstavlja fazu infekcije u kojoj su dijagnostički testovi nemoćni u detekciji iste. Serološki testovi, koji su ujedno i najviše u upotrebi, nemoćni su u tom periodu jer organizam još nije razvio dovoljnu količinu antitijela koja bi se mogla detektirati. Zato na značaju dobivaju noviji, molekularni testovi koji traže

genom infektivne čestice. Ta novija generacija testova je smanjila taj period, ali on još uvijek postoji. Tim testovima *window period* je kraći jer su testovi osjetljiviji, pa nivo infektivnog genoma u kratkom vremenu od početne infekcije dosegne detektibilnu razinu.

Kod HIV infekcije dijagnostički prozor češćeg oblika bolesti - HIV-1 RNA u plazmi i antitijela, može varirati između 10 i 27 dana, ovisno o putu zaraze. Novijim testovima, testovima treće generacije, detekcija p24 Ag je od 9 do 17 dana ranije, pa se s razlogom p24 Ag naziva ranim markerom infekcije.(52)

Detekcija anti-HCV At također je otežana. Uvođenjem SMART (engl. *stimulating maximal antibody response tube*) epruveta, period se smanjio. Te su epruvete primjenjive za ranu detekciju, unutar tjedan dana od infekcije. Koriste se kao predanalitički uređaj jer tretiraju krv prije testiranja. Stimuliraju se limfociti u *in vitro* uvjetima pa je ranije oslobađanje protutijela.(53)

Kod hepatitisa B novije NAT testiranje pokazuje kraći dijagnostički prozor u odnosu na testove za detekciju HBsAg, uz napomenu da je velika razlika uočena kod pojedinačnih (engl. *single-sample*) testiranja, ne kod skupnih (engl. *pooled*) testiranja. *Pooled* NAT značajan je ipak u visoko endemskim područjima HBV infekcije. U skoroj budućnosti ukupna potvrda HBV infekcije oslanjati će se na *single-sample* NAT, osim kod kronično inficiranih, kod kojih je još uvijek HBsAg nezamjenjiv, pouzdani marker (54).

Ne smijemo svakako ni zaboraviti veliki broj lažno pozitivnih rezultata, što je s epidemiološke strane zabrinjavajuće zbog krive procjene prevalencije, kao i činjenice da se na temelju takvih rezultata testova odbacuju brojni ispravni transfuziološki preparati.

#### 4. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada bio je učiniti epidemiološki i dijagnostički osvrt na bolesti prenosive krvlju. U principu, to je bio osvrt na jednu od najučestalijih skupina zaraznih bolesti, koje su izazov suvremene medicine u svakom pogledu. U prvom dijelu rada pokazane su određene specifičnosti i zanimljivosti samih infekcija, a u drugom dijelu je istaknuto kako se statistički i teoretski podaci mogu iskoristiti u praktične svrhe, u ovom slučaju, u dijagnostici. Testovi na kojima se zasniva suvremena medicinsko-laboratorijska dijagnostika su serološki i molekularni. U rutinskom radu to su ELISA i IFA testovi iz serološke skupine testova, a PCR, TMA i *Western blotting* iz molekularne skupine testova.

## SAŽETAK

U skupinu krvlju prenosivih bolesti ubrajamo infekcije koje predstavljaju jedan od najvećih globalnih opterećenja zdravstvenih sustava. Njihova učestalost i proširenost mjeri se u milijunskim brojkama, a od infekcija od interesa (HIV, HBV, HCV) najveći globalni teret je ipak HBV infekcija. Međutim, HIV infekcija je zbog svojih specifičnih epidemioloških značajki dobila na posebnom značaju u ovom radu. Rizične skupine za spomenute infekcije su: zdravstveni radnici, intravenski korisnici droga, novorođenčad zaraženih trudnica, osobe homoseksualne orijentacije, primatelji organa i transfuzija krvi, ali i ljubitelji ukrašavanja tijela tetovažama i *piercing-om*. Farmakološka industrija nema razvijenu pre-ekspozicijsku profilaksu za sve navedene infekcije pa se u uvjetima gdje nema podizanja svijesti, kao što su manje razvijene zemlje, infekcije neumoljivo šire. Dijagnostika spomenutih infekcija oslanja se na serološku i molekularnu laboratorijsku dijagnostiku, a razvijena je do zavidnog nivoa. Serološki testovi koje se izvode rutinski su ELISA i IFA testovi, a od molekularnih PCR, TMA i *Western blotting*. Najveća prednost dijagnostičkih postupaka je razvitak *point-of-care* testova (POCT), a najveći problem predstavlja fenomen dijagnostičkog prozora (*window period*).



## SAŽETAK (na engleskom)

### SUMMARY

Infections are blood-borne diseases which pose the greatest burden to the health care systems worldwide. Their incidence and prevalence are measured in millions, but what concerns us the most among the infections of interest (HIV, HBV and HCV) is the HBV infection which represents the greatest threat to world's population. However, due to its specific epidemiological features, HIV infection was discussed in more detail. Risk groups for mentioned infections are: health workers, drug addicts, newborns of infected pregnant women, homosexuals, recipients of organs and blood transfusions as well as tattoos and body piercing fans. Unfortunately, pre-exposure prophylaxis for all these infections has not yet been developed by pharmaceutical industry. Consequently, the infections are spreading relentlessly, especially in less developed parts of the world where the awareness of such diseases is practically nonexistent. Diagnostics of the infections, which has developed to an enviable level, relies on serological and molecular laboratory diagnostics. Serological tests that are performed routinely are ELISA and IFA tests; molecular ones are PCR, TMA and Western blotting. The biggest advantage of diagnostic procedures is the development of point-of-care tests (POCT), while their biggest problem is the phenomenon of the diagnostic window (*window period*).

## **ŽIVOTOPIS**

**Ime i prezime:** Josipa Bikić

**Datum i mjesto rođenja:** 5. prosinca 1992.g. ,Šibenik

**Školovanje:** Osnovna škola „Antun Mihanović“ Gradac

Srednja škola „Ivan Meštrović“ Drniš

**Datum upisa studija:** 14. srpnja 2011.g

**Dodatne vještine:** poznavanje engleskog jezika

rad na računalu

**Radno iskustvo:** dm-drogerie markt, kontrola polica

Maris, z.s.u.o.; ispomoć u kuhinji

## LITERATURA:

- (1) Centers for Disease Control and Prevention. Blood safety: Diseases and Organisms. Dostupno na: <http://www.cdc.gov/bloodsafety/bbp/diseases-organisms.html>
- (2) Romanò L, Paladini S, Galli C, Raimondo G, Pollicino T, Zanetti AR. Hepatitis B vaccination: are escape mutant viruses a matter of concern? 2014;11. *U tisku*
- (3) Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, Simmonds P. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*. 2014;59:318-27.
- (4) Ministarstvo zdravlja. Zarazne bolesti. Dostupno na: [http://www.zdravlje.hr/zdravlje/zarazne\\_bolesti](http://www.zdravlje.hr/zdravlje/zarazne_bolesti)
- (5) Mlinarić Galinović G, Ramljak Šešo M i sur.: Specijalna medicinska mikrobiologija i parazitologija . Merkur A.B.D., Zagreb, 2003.
- (6) Centers for Disease Control and Prevention: HIV testing. Dostupno na: <http://www.cdc.gov/hiv/basics/whatishiv.html>
- (7) World Health Organization: Global summary of AIDS epidemic 2013. Dostupno na: [http://www.who.int/hiv/data/epi\\_core\\_dec2014.png?ua=1](http://www.who.int/hiv/data/epi_core_dec2014.png?ua=1)
- (8) World Health Organization: Global Health Observatory: HIV/AIDS. Dostupno na: [http://www.who.int/gho/hiv/hiv\\_013.jpg?ua=1](http://www.who.int/gho/hiv/hiv_013.jpg?ua=1)
- (9) European Centers for Disease Control and Prevention: Surveillance Report. Dostupno na: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/hiv-aids-surveillance-report-2012-20131127.pdf>
- (10) World Health Organization: Hepatitis B. Fact sheet. Dostupno na: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>
- (11) Centers for Disease Control and Prevention: Recommendation for Identification and Public Health Management of Persons with Chronic Hepatitis B Virus Infection. Dostupno na: <http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr5708.pdf>
- (12) World Health Organization Regional Office for Europe: Health For All Database. Dostupno na: <http://data.euro.who.int/hfadb/>
- (13) World Health Organization: Hepatitis C. Fact sheet. Dostupno na: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>
- (14) Grahovac B, Hadžisejdić I. Molekularna dijagnostika hepatitisa C. *Medicina*. 2006;42:132-7.
- (15) Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za HIV. Dostupno na: <http://hzjz.hr/?s=registar+za+hiv>

- (16) Hrvatski zavod za javno zdravstvo: Epidemiologija HIV infekcije i AIDS-a u Hrvatskoj.  
Dostupno na: <http://hzjz.hr/sluzbe/sluzba-za-epidemiologiju/odjel-za-pracenje-zaraznih-bolesti/odsjek-za-hivaidi-i-druge-spolno-i-krvlju-prenosne-infekcije/>
- (17) Nemeth Blažić T, Pavlič J. Epidemiologija HIV/AIDS-a u Hrvatskoj i rad centara za besplatno i anonimno savjetovanje i testiranje na HIV. *Infektološki Glasnik*. 2013;33:27-33.
- (18) Hrvatski zavod za javno zdravstvo: Dobrovoljno savjetovanje i testiranje na HIV i savjetovanje o spolno prenosivim bolestima.  
Dostupno na: <http://hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/2-Centri-za-HIV-savjetovanje-i-testiranje-web2013-konacna.pdf>
- (19) Krišto D, Bogadi Šare A, Knežević B. Informiranost zdravstvenih djelatnika o postupku kod ubodnih incidenata. Zbornik radova 4. međunarodnog stručno-znanstvenog skupa Zaštita na radu i zaštita zdravlja (Vučinić J, Kirin S. (ur.)), Karlovac, Veleučilište u Karlovcu, 2012., str. 185-190
- (20) Falagas ME, Karydis I, Kostogiannou I. Percutaneous Exposure Incidents of the Health Care Personnel in a Newly Founded Tertiary Hospital: A Prospective Study. *PLoS One*. 2007;2:e194.
- (21) Beltrami EM, Williams IT, Shapiro CN, Chamberland ME. Risk and Management of Blood-Borne Infections in Health Care Workers. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13:385-407.
- (22) Centers for Disease Control and Prevention: About HIV.  
Dostupno na: <http://www.cdc.gov/hiv/basics/whatishiv.html>
- (23) Centers for Disease Control and Prevention: HBV FAQs for Health Professionals.  
Dostupno na: <http://www.cdc.gov/hepatitis/HBV/HBVfaq.htm>
- (24) Centers for Disease Control and Prevention: The ABCs of hepatitis. Dostupno na: <http://www.cdc.gov/hepatitis/Resources/Professionals/PDFs/ABCTable.pdf>
- (25) Leading HIV/AIDS groups endorse CDC HIV PrEP Guidelines.  
Dostupno na: <http://www.prepwatch.org/wp-content/uploads/2014/05/Advocates-joint-statement-to-the-CDC-PrEP-Guidelines.May-15.pdf>

- (26) Hrvatski zavod za javno zdravstvo: Kalendar kontinuiranog cijepljenja u Hrvatskoj u 2014. god.  
Dostupno na: <http://hzjz.hr/sluzbe/sluzba-za-epidemiologiju/odjel-za-prevenciju-zaraznih-bolesti-i-cijepljenje/>
- (27) Damir Grgičević i Tomislav Vuk: Imunohematologija i transfuzijska medicina. Medicinska naklada, Zagreb, 2000.
- (28) Čvorišćec D, Čepelak I: Štrausova Medicinska biokemija. Medicinska naklada, Zagreb, 2009.
- (29) Biokemijske epruvete.  
Dostupno na: <http://www.pic2fly.com/Blood-Draw-Tube-Top-Colors.html>
- (30) Hepatitis B virus. Dostupno na:  
[http://en.wikipedia.org/wiki/File:Hepatitis\\_B\\_virus.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Hepatitis_B_virus.png)
- (31) A Comprehensive Immunization Strategy to Eliminate Transmission of Hepatitis B Virus Infection in the United States. Dostupno na:  
<http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/rr/rr5516.pdf>
- (32) Acute HBV infection with recovery. Dostupno na:  
[http://www.hepb.org/professionals/positive\\_hbv\\_tests.htm](http://www.hepb.org/professionals/positive_hbv_tests.htm)
- (33) Progression to chronic HBV infection. Dostupno na:  
<http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/hepatology/hepatitis-B/>
- (34) Viral hepatitis. Online serology training. Dostupno na:  
<http://www.cdc.gov/hepatitis/Resources/Professionals/Training/Serology/training.htm>
- (35) Hepatitis C virus. Dostupno na: <http://udel.edu/~kdob/HCVtaxonomy.html>
- (36) HCV infection. Dostupno na: [http://en.wikipedia.org/wiki/Hepatitis\\_C](http://en.wikipedia.org/wiki/Hepatitis_C)
- (37) STDs. HIV infection: Detection, Counseling, and Referral. Dostupno na:  
<http://www.cdc.gov/std/treatment/2010/hiv.htm>
- (38) HIV virus. Dostupno na: <http://science.howstuffworks.com/life/cellular-microscopic/aids2.htm>

- (39) Schematic representation of the timing of the appearance of biological markers of HIV infection. Dostupno na:  
<http://www.phsanewsletters.ca/bccdc/View.aspx?id=139925&print=1&p=9891>
- (40) ELISA Immuno Explorer™ Kit. Instruction Manual. Dostupno na:  
[http://www.tccbiotech.org/files/documents/BioRad\\_ELISAmannual.pdf](http://www.tccbiotech.org/files/documents/BioRad_ELISAmannual.pdf)
- (41) Serologic methods manual. Dostupno na: [http://www.criver.com/files/pdfs/research-models/rm\\_ld\\_r\\_serologic\\_methods\\_manual.aspx](http://www.criver.com/files/pdfs/research-models/rm_ld_r_serologic_methods_manual.aspx)
- (42) Đaković Rode O. Point-of-care (POC) testiranje u dijagnostici infektivnih bolesti. *Infektološki Glasnik*. 2012;32:25-30.
- (43) Butorac A, Marić M, Badanjak Sabolović M, Hruškar M, Rimac Brnčić S, Bačun Družina V. Analitičke metode u forenzici hrane. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*. 2014;8:90-101.
- (44) Molekularna dijagnostika. Dostupno na: [www.roche.hr](http://www.roche.hr)
- (45) Buckingham, L. *Molecular diagnostics: Fundamentals, methods and clinical applications*. Davis Company, 2011.
- (46) Scott JD, Gretch DR. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection: a systematic review. *JAMA*. 2007;297:724-32.
- (47) Principle of PCR. Dostupno na: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>
- (48) Western blot. Dostupno na: <http://molecularstation.com/protein/western-blot>
- (49) Protein related products. Dostupno na:  
[http://www.viswagenbiotech.com/protein\\_related.jsp](http://www.viswagenbiotech.com/protein_related.jsp)
- (50) ELISA advantages. Dostupno na: <http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/elisa-advantages>
- (51) IFA technical sheet. Dostupno na: [http://www.criver.com/files/pdfs/research-models/rm\\_ld\\_r\\_ifa\\_tech\\_sheet.aspx](http://www.criver.com/files/pdfs/research-models/rm_ld_r_ifa_tech_sheet.aspx)
- (52) Weber B, El Hadji Mbargane Fall, Berger A, Doerr HW. Reduction of diagnostic window by new fourth-generation human immunodeficiency virus screening assays. *J Clin Microbiol*. 1998;36:2235-9.
- (53) Window period detection of HCV antibodies by in vitro lymphocyte stimulation. Dostupno na:

[http://www.cdc.gov/hepatitis/Resources/MtgsConf/HCVSymposium2011-PDFs/15\\_Jehuda.pdf](http://www.cdc.gov/hepatitis/Resources/MtgsConf/HCVSymposium2011-PDFs/15_Jehuda.pdf)

- (54) Kuhns MC, Busch MP. New strategies for blood donor screening for hepatitis B virus: nucleic acid testing versus immunoassay methods. *Mol Diagn Ther.* 2006;10:77-91.