

УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ - ШТИП

ФАКУЛТЕТ ЗА МЕДИЦИНСКИ НАУКИ

Втор циклус студии

Специјалистички стручни студии

**Студиска програма за дипломиран лаборант по медицинска лабораториска
дијагностика специјализиран за работа во
хемиско-биохемиска лабораторија**

Елизабета Илиќ

ТРАНСФУЗИСКО ТЕСТИРАЊЕ НА МАРКЕРИ НА ХЕПАТИТ ТИП Б

Специјалистички труд

Штип, 2020

Ментор: Проф. д-р Татјана Рушковска
Факултет за медицински науки

Комисија за оценка и одбрана:

Претседател: Доц. д-р Даринка Ѓоргиева Ацкова
Факултет за медицински науки

Член: Доц. д-р Мире Спасов
Факултет за медицински науки

Член: Проф. д-р Татјана Рушковска
Факултет за медицински науки

Датум на одбрана: _____

Елизабета Илиќ

Трансфузиско тестирање на маркери на хепатит тип Б

Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип

Содржина:

Краток извадок.....	1
Abstract.....	2
1. Вовед.....	3
1.1. Трансфузија.....	4
1.2. Крводарување.....	6
1.3. Вирус на хепатит тип Б.....	10
1.3.1. Градба и структура на HBV	10
1.3.2. Геном на HBV	11
1.3.3. Репликација на HBV	13
1.3.4. Начин на пренесување, симптоми и тек на болеста	14
1.4. Маркери на HBV	16
1.5. Ризик од трансфузиска трансмисија на HBV.....	18
1.6. Мерки на претпазливост за превенција од HBV.....	19
1.7. Тестирање на HBV со СМИА.....	20
1.8. Полимераза верижна реакција (PCR).....	25
2. Цел на трудот	29
3. Пациенти и методи.....	30
4. Резултати и дискусија	31
5. Заклучоци	37
6. Користена литература	39

Краток извадок

Хепатит Б е инфективно воспалително заболување на црниот дроб, предизвикано од хепатитис вирус тип Б. Се пренесува преку крв, од мајка на дете во текот на бременоста, кај зависниците со користење на инфицирани игли, кај останатата популација при хируршки или стоматолошки интервенции со контаминирани медицински инструменти и преку незаштитен полов однос. Болеста најчесто се јавува во акутна фаза и завршува со комплетно излекување, но може да добие и хроничен карактер и по тешко боледување да заврши со смрт. За лекување на хепатит Б се користи симптоматска терапија, а како превентива постои вакцина, која се прима 24 часа по раѓање. Современото трансфузиско згрижување на пациентите, подразбира подготовка на максимално сигурни крвни компоненти, без ризик од трансфузиско-трансмисивна инфекција со хепатит Б. Со воведувањето на нови поосетливи и специфични тестови за детекција на маркерите на хепатит Б и употребата на PCR (Polymerase chain reaction) методата во молекуларната дијагностика, ризикот за трансмисија на хепатит Б преку трансфузија на крв е сведен на минимум.

Целта на овој труд беше да се анализираат и споредат резултатите за рана детекција на HBsAg, добиени со хемилуминисцентна метода (CMIA) и PCR методата, кај доброволни дарители на крв и пациенти за предоперативни испитувања при ГОБ „8-ми Септември“, со што се потврди високата сензитивност на CMIA методата, како и фактот дека понекогаш може да се добијат и „лажно“ позитивни резултати.

Истражувањето укажува на тоа дека треба внимателно да се интерпретираат резултатите кај здрави испитаници, како и потребата за подлабока анализа на причините кои доведуваат до различни резултати помеѓу двете методи.

Клучни зборови: трансмисија, серолошка дијагностика, молекуларна дијагностика

Abstract

Hepatitis B is infectious, inflammatory disease of the liver, caused by hepatitis B virus. It is transferred through blood, from mother to child during pregnancy, using infected needles among drug addicts, using contaminated medical instruments during surgical or dental interventions, and through unprotected sexual intercourse. The disease often appears in acute phase and it ends with overall healing, but it can get a chronic character and after a severe illness to cause death. Symptomatic therapy is used as a treatment for hepatitis B, and for preventive measures, a vaccine is injected 24 hours after birth. The modern transfusion caring of the patients means preparing maximum secure blood components, without risk of transfusion-transmissible infection with hepatitis B. With the introduction of new, more sensitive and specific test for detection of the markers of hepatitis B and using PCR method in molecular diagnostics, the risk of transmission of hepatitis B through blood transfusion is brought down to minimum.

The goal of this study was to analyze and compare the results of early detection of HbSAg, obtained with chemiluminescent method (CMIA) and the PCR method, at voluntary blood donors and patients for preoperative tests in "8-mi Septemvri", which confirm the high sensitivity of the CMIA method, as well as the fact that sometimes "false" positive results can be received.

The research indicates that the results of healthy respondents should be interpreted very carefully, as well as the need for deeper analysis of the causes which lead to different results among two methods.

Key words: transmission, serology diagnostics, molecular diagnostics

1. Вовед

Современиот здравствен систем не може да се замисли без соодветна супортивна терапија со крв и крвни продукти. За обезбедување на доволни количини крв и нејзината безбедност е одговорна службата за трансфузиска медицина. Ризикот од трансмисија на причинители на инфективни заболувања со трансфузија на крв секој ден е сè помал, благодарение на заострените критериуми за избор на дарителите на крв, како и усовршување на постапките за прибирање и преработка на крвните компоненти. Од трансфузиолошки аспект, можноста за трансфузиско-трансмисивна вирусна инфекција со хепатит тип Б зависи пред сè од застапеноста на инфективниот агенс во општата популација, особено во популацијата на дарители на крв и отсуството на имунитет кај примателите на крвните компоненти. Резидуалниот ризик е непосредно поврзан со т.н. „период на прозорец“ кога дарителот е инфициран, но со ниеден тест не може да се детектира инфекцијата. Тоа е период пред сероконверзијата, односно пред појавата на маркерите на хепатит тип Б во крвта на дарителот. Должината на периодот на прозорец, пак, зависи од природата на инфективниот агенс и технологијата која се користи за негово тестирање. Во нашата земја, како и во повеќето европски земји и ширум светот, задолжително е тестирање на секоја крвна единица на маркери на хепатит тип Б со имуноензимски тестови. Кај дарителите на крв во нашата земја преваленцијата на HBV (hepatitis B virus) изнесува 0,23%. Податоците покажуваат дека и во најразвиените земји, во кои обемот на тестирање е најширок, а тестовите се технолошки на највисоко ниво (молекуларно тестирање), не е достигнато нулта ниво на ризик од пренос на HBV инфекција (Благоевска и сор., 2014).

1.1. Трансфузија

Функционирањето и животот на ткивата и органите во човековиот организам зависат од циркулацијата на крвта, преку која се обезбедува доволно количество на кислород и храна, потребни за синтеза на органски материи, енергија и размножување од една страна, и отстранување на крајните производи на катаболизмот, од друга страна. Исто така животните процеси во организмот не може да се замислат без физиолошка циркулација на крв, и затоа секое крвавење, особено оние крвавења кои се проследени со губење на поголема количина на крв со што сериозно се нарушува циркулацијата, се сметаат за животозагрозувачки.

Трансфузија претставува процес со кој се пренесува крв или крвни компоненти добиени од една индивидуа на друга индивидуа, која има терапевска потреба од истите. Директна трансфузија од човек на човек одамна не се практикува, туку се користи индиректна трансфузија, каде што со помош на антикоагуланси крвта може извесен период да се складира, за во одреден момент, кога ќе биде потребно, да се искористи како терапевско средство кај пациентот. Индикации за трансфузија на крв и крвни деривати се:

- Во хирургијата – крвавења од различна природа, шок, итни абдоминални интервенции, хипопротеинемија, метаболни нарушувања и при екстракорпорален крвоток.
- Во гинекологијата и акушерството – крвавења предизвикани од миоми, полипи и хируршки интервенции на полните органи кај жената, крвавења во текот на породувањето и анемии по породувањето, кои настануваат како резултат на претходно постојни подолготрајни анемии во текот на бременоста.
- Во интерната медицина – кај рефракторни анемии, хеморагиски синдроми, тешки хипоалбуминемии, постхеморагични анемии, хемолитички анемии, акутно губење на плазма и други состојби.
- Во случаи со тешки изгореници – каде што постои состојба на голема загуба на течности и намален волумен на циркулирачка крв.

- Во педијатријата – при инфекции, интоксикации, авитаминози и неправилна исхрана што се одразува со нагло опаѓање на бројот на еритроцитите и хемоглобинот (Динић, 1966).

И покрај тоа што при многу состојби кај пациентите е пожелна трансфузија на крв или крвни компоненти, секако дека не треба да се занемари фактот дека трансфузијата е секогаш проследена со одредени ризици за примателот, и треба да се практикува само кај оправдани индикации кои се јасно дефинирани и да се ограничи само на места кога нема друг избор.

Трансфузиски реакции кои можат да настанат по применување на трансфузија се:

- Акутна хемолитичка трансфузиска реакција,
- Фебрилна нехемолитичка трансфузиска реакција,
- Алергиски и анафилактични реакции,
- Септикемија – септичен шок,
- Акутно оштетување на белите дробови предизвикано од трансфузија,
- Циркулаторно преоптоварување,
- Изолирана хипотензивна реакција,
- Посттрансфузиска хемосидероза,
- Посттрансфузиска пурпура,
- Имуномодулација,
- Болест на „калем против домаќин“ – предизвикана од трансфузија,
- Трансмисија на инфективни агенси.

Симптоми од трансфузиски реакции кои можат да се јават кај примателите се: треска, покачена телесна температура, мачнина, повраќање, дијареја црвенило, чешање, исип, диспнеја, хемоглобинурија и други симптоми.

Според Интернационалното здружение за трансфузија на крв, терминот хемовигилност е дефиниран како „сет од процедури за надзор кои го покриваат целокупниот трансфузиски синџир, од прибирањето на крв и крвни компоненти, па сè до следењето на пациентот, со цел да се соберат и обработат информациите за неочекуваните и несаканите ефекти од тераписката употреба на лабилните крвни продукти и да се превенира нивното случување“ (Благоевска и сор., 2014).

1.2. Крводарување

Денеска, кај нас и во светот потребата за крв и крвни продукти е зголемена и сè уште расте поради зголемување на бројот на сообраќајните незгоди, несреќи од друга природа и повреди кај населението, како и поради воспоставување на нови современи дијагностички методи и третмани во медицината при кои се користи трансфузија на крв. Затоа секоја земја треба да има креирано своја политика за самоснабдување и самообезбедување со крв и крвни компоненти за задоволување на потребите граѓаните преку доброволни дарители на крв. Тоа значи дека треба да има постојана достапност на доволни количини на крв во секое време, максимално безбедни за примателите и најважно нивна рационална и клинички оправдана употреба. Затоа се прават кампањи за поттикнување на населението да дарува крв, преку соодветни програми кои содржат информации колкаво е значењето на даруваната крв, колку можат да допринесат за спасувањето на еден човечки живот, но и за позитивните ефекти кои се чувствуваат кај поединецот кој дарува крв.



Слика 1. Мотивација за крводарување
Figure 1. Motivation for donating blood

Крводарител може да биде секое лице кое е во добра здравствена состојба и има добра медицинска историја. Возраста за крводарување е од 18 до 65 години, дарителот треба да има над 50 kg телесна тежина, жените треба да имаат вредност на хемоглобин над 125 g/L и е дозволено да даруваат на секои четири месеци, а кај мажите вредноста на хемоглобинот треба да изнесува над 135 g/L, и можат да даруваат секои три месеци. Постојат и други критериуми за прифаќање или одбивање на дарител кои се проценка на доктор трансфузиолог кој ја врши клиничката инспекција и анамнеза на потенцијалниот дарител. Во нашата земја крводарувањето е доброволно, неплатено и анонимно, а се заснова врз база на хуманост и етика. Крводарувањето е процедура која трае околу триесетина минути и ги опфаќа следниве чекори:

- регистрација на дарител,
- задолжителен лекарски и лабораториски преглед,
- пополнување прашалник и потпишување информирана согласност,
- дарување крв.

Кесите кои се користат за крводарување се за еднократна употреба, со затворен систем за пункција, без можност од инфицирање на дарителот. Се зема 450 mL, што претставува 10% од вкупната крв во организмот, а дарителот губи околу 200 mg на железо кое се надокнадува во текот на првиот месец по дарувањето. Течниот дел од крвта се надокнадува во првите 24 часа по дарувањето, а во текот на следните 4 до 6 недели се обновуваат и надокнадуваат еритроцитите. Кесите содржат конзерванс кој овозможува вијабилност и функционалност на еритроцитите до 35 дена, чувани во фрижидер на температура од 4 - 6°C. Дарувањето трае од 6 до 10 минути, венепункцијата ја изведува трансфузист под надзор на лекар во наредните последователни постапки:

- Сместување на дарителот во полуседната положба и подврзување на раката од која ќе дарува со езмарх 10 cm над кубиталната регија.
- Дезинфекција на кожата и се чека местото да се исуши без дополнително допирање.

- Повторна проверка на идентитетот на дарителот непосредно пред венепункцијата, проверка на кесата и пилот епруветите.
- По пункцијата, се олабавува езмархот, првите 20 mL одат во предонациското кесе од кое се полнат пилот епруветите за тестирање, а потоа крвта се насочува кон кесата за донирање.
- По завршување на дарувањето местото се заштитува со стерилна вата и се врзува со завој кој треба да остане два часа по дарувањето.
- Набљудување на дарителот, следење на неговата физиолошка состојба 15 минути по дарувањето, препознавање на несакани реакции и навремено санирање на истите доколку се јават.
- Послужување на дарителот со благодарен оброк и совети за одмор и исхрана со повеќе течности.



Слика 2. Крводарување
Figure 2. Blood donation

По колекционирањето, кесите со крв подлежат на предтрансфузиско тестирање. Со предтрансфузиското тестирање се одредува или потврдува крвната група, Rh факторот, се врши детекција на ирегуларни антитела и се прават тестови за детекција на крвно преносливи болести како што се хепатит Б, хепатит Ц, вирус на хумана имунодефициенција и сифилис. Дури откако ќе се добијат сите резултати, документирани и заведени во протоколи, кесата се означува како безбедна за употреба, се етикетира, се потпишува од страна на доктор трансфузиолог и се складира во фрижидери специјални за чување на крвните единици.



Слика 3. Складирање и чување крв
Figure 3. Storage and blood keeping

Згрижувањето на пациентите со крв сè уште е следено со ризик од трансмисивни инфекции со инфективни агенси, бидејќи сè уште не се воведени вируцидни постапки врз крвта и крвните продукти за нивна инактивација. Заеднички карактеристики на инфективните агенси кои можат да бидат пренесени со трансфузија се следниве:

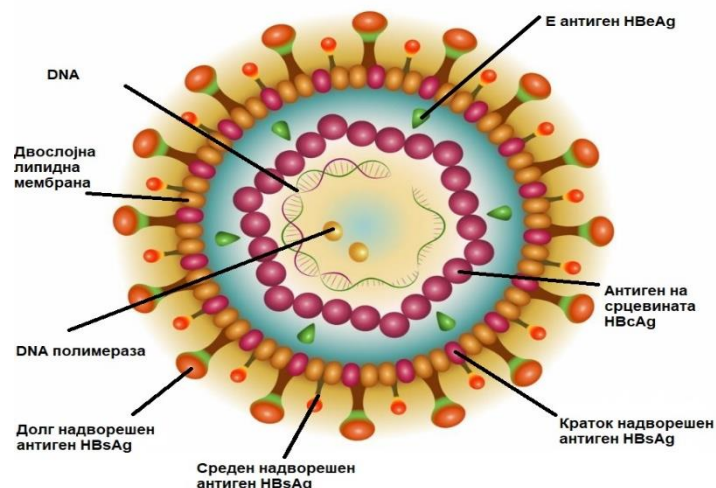
- Релативно долго присуство во циркулацијата,
- Релативно долг инкубационен период,
- Можност да предизвикаат асимптоматска инфекција,
- Остануваат стабилни во хемопродуктите.

Денеска на располагање се бројни тестови со висока осетливост за детекција на инфективните агенси кај дарителите на крв, но за жал со нивната примена не може да се откријат кај оние дарители кои се инфицирани непосредно пред дарувањето (Тасески и сор., 1998).

1.3. Вирус на хепатит тип Б

1.3.1. Градба и структура на HBV

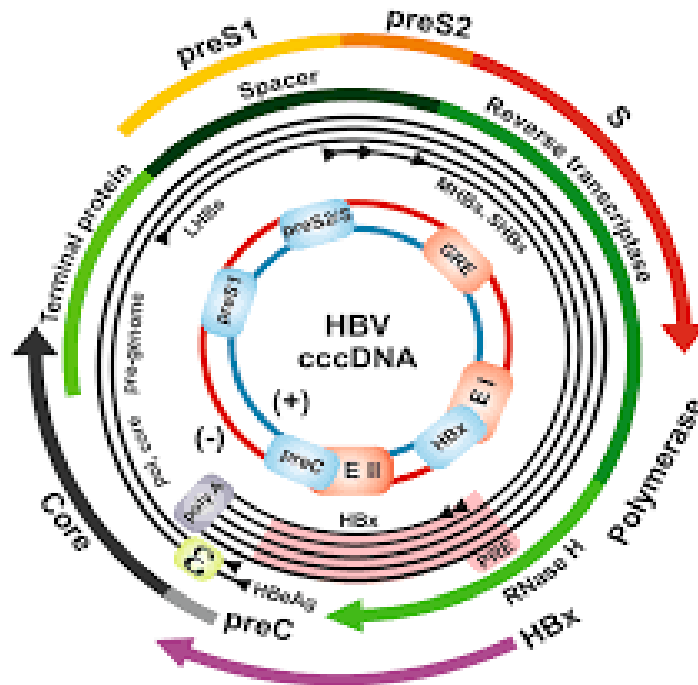
Човечкиот Hepatitis B virus (HBV) припаѓа на фамилијата Hepadnaviridae. Потполниот вирус е познат како Данеова партикула и има сферичен облик со големина 42 nm. Поседува обвивка со дебелина од 7 nm изградена од липиди, протеини и јаглехидрати, во чиј состав влегуваат мали, средни и долги пептиди означени како надворешен HBsAg (Hepatitis B surface antigen). Данеовата партикула е инфективна само доколку е во облик на комплетен вирус, но во крвта кај заболени може да се појават и некомплетни партикули во облик на HBsAg во тубуларен или сферичен облик, кои се неинфективни. Внатрешната обвивка е наречена срцевина (core) која го содржи HBcAg и не се сретнува во крвта кај инфицираните индивидуи, но предизвикува создавање на антитела anti-HBc како имунолошки одговор на организмот. Помеѓу двете обвивки се наоѓа антигенот HBeAg, и неговата зголемена концентрација во крвта зборува за голема репликација на вирусот, а појава на антитела anti-HBe укажува на поминување на болеста. Наместо јадро, геномот на вирусот претставува нуклеокапсид со шестоаголен облик во кој е содржана DNA, а на неа ковалентно се врзани DNA полимераза и протеин киназа.



Слика 4. Вирус на Хепатит Б
Figure 4. Hepatitis B Virus

1.3.2. Геном на HBV

Геномот на HBV е спакуван во внатрешна капсула – нуклеокапсид. Структурата на геномот е специфична, и претставува циркуларна, двоверижна, а на одделни места едноверижна DNA, која поседува преклопувачки отворени кодирачки сегменти.



Слика 5. Геном на вирусот на хепатит тип Б
Figure 5. Hepatitis B genome

Репликацијата на вирусниот геном е необична – DNA на вирусниот геном, синтетизирана со реверзна транскриптаза, има повеќе преписи на DNA (3400 бази) од природната должина на DNA геномот (3200 бази). Генетските информации на вирусот се локализирани на долгата верига на DNA (3200 нуклеотиди), а се содржани во четири отворени кодирачки сегменти (се однесува на гените S, C, P и X) кои ја регулираат синтезата на различни пептиди.

Бројот на пептидите е определен со гените кои се содржат во вирусниот геном. Постојат мултипли „покренувачки места“, така што секвенците за различни пептиди се преклопуваат. Генот S, кој вклучува два региона пре-S1 и пре-S2, ја

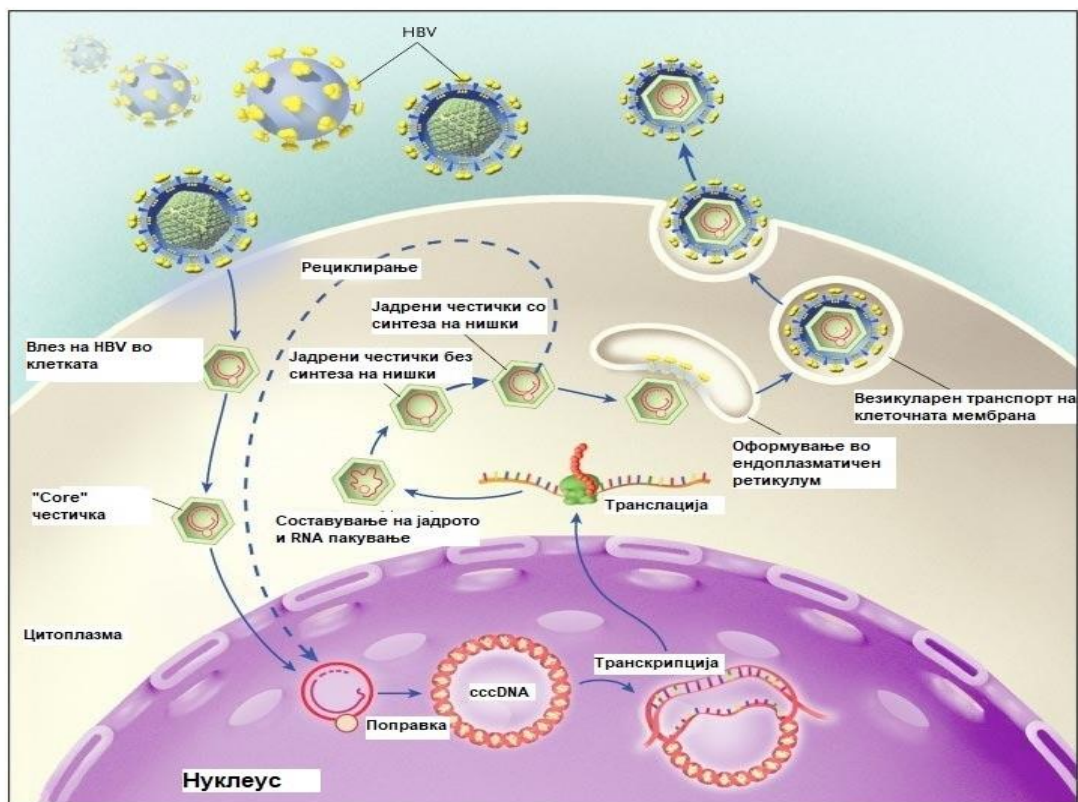
кодира синтезата на пептидите од површинскиот антиген, кои се соединуваат во надворешната обвивка на вирусот, и на тој начин се дефинираат површинските антигени. S-пептидите ги формираат неинфективните HBsAg честички и тубули, кои се главна карактеристика на инфекцијата со HBV. HBsAg постои во три облика кои се разликуваат по нивната молекулска маса. Најмалиот облик е делумно гликозилиран протеин од 24 kDa. Двата поголеми облика имаат додатни 70 (пре-S2 протеин) или 150 аминокиселини (пре-S1 протеин). Инфицираните хепатоцити синтетизираат HBsAg во количина која го надминува потребното количество за комплетирање на вирусната Данеова честичка. Остатокот од вирусниот материјал се ослободува во циркулацијата како мали сферични партикли со големина од 22 nm или тубуларни структури. Бројот на овие партикли во серумот може да го надмине бројот на вистинските партикли на вирусот, ниво кое лесно може да се детектира со ензимско-имунолошки тестови. Всушност HBsAg е првиот серолошки маркер на HBV, откриен од страна на Блумберг (Blumberg) 1963 година и докажан во циркулацијата со антитела anti-HBs.

Генот С исто така има две покренувачки места. Природната должина на пептидот настанат со транслација е околу 22 kDa, (односно 183 до 185 аминокиселини), а пептидот на срцевината е составен дел на вирусната капсула. Постојењето на антигенот HBcAg прв го докажал Алмеида (Almeida) со имуноелектронско-микроскопски студии на вирионот, разорен со детергенти.

Покрај ова, може да биде синтетизиран и еден мал пептид со величина од околу 16 kDa, во чија структура недостасуваат 34 С-терминални аминокиселини, места за врзување на DNA. Тој пептид се синтетизира во текот на репликацијата на вирусот и не се вградува во вирусната честичка, туку се ослободува во растворлив облик и е означен како HBeAg (индиректен маркер за репликација на вирусот) (Тасески и сор., 1998).

1.3.3. Репликација на HBV

Вирусот на хепатитис тип Б нема директно цитопатогено дејство и механизмите на тој процес сè уште не се доволно разјаснети. На обвивката содржи рецептори за полимерите на серумските албумини, кои се наоѓаат на површината на хепатоцитите, што го овозможува неговиот тропизам спрема овие клетки. Првично доаѓа до апсорпција на вирусот преку рецепторите на мембраната, а потоа до пенетрација во цитоплазмата. Вирусот се размножува во јадрото на хепатоцитите, формирајќи „јадро“ на вирусот, кое во цитоплазмата, поточно во ендоплазматичниот ретикулум си создава обвивка, и како комплетен вирус – Данеова партикула, го напушта хепатоцитот. По напуштањето на вирусот, хепатоцитот некротизира со механизми кои сè уште не се доволно познати. Во серумот на заболените може да се јават и само делови на вирусот во форма на HBsAg (Стоилова, 2010).



Слика 6. Репликација на вирусот хепатит тип Б
Figure 6. Hepatitis B virus replication

1.3.4. Начин на пренесување, симптоми и тек на болеста

HBV е застапен во крвта, а во помали концентрации во семената течност, вагиналниот секрет, плунката, потта, мајчиното млеко, солзите и урината. Вирусот е отпорен на надворешните услови, а во засушена крв може да преживее и една недела. Се проценува дека на светско ниво околу 300 милиони луѓе се носители на HBV, а 500 000 годишно умираат од оваа болест.

HBV најчесто се пренесува преку крв со хоризонтална трансмисија и тоа:

- Со користење на инфицирани игли кај зависници, при тетовирање, акупунктура, пирсинг, дупчење на ушите со контаминирана опрема и преку незаштитен сексуален однос.
- Во болниците од пациент на лекар по пат на контаминирани инструменти, од пациент на пациент при хируршки и стоматолошки интервенции со употреба на нестерилна опрема и инструменти, со трансфузија на крв и крвни компоненти и преку трансплантација на органи.
- Со близок контакт кога телесните течности ќе дојдат во контакт со оштетена кожа или слузокожа, најчесто во детската возраст.

Вертикална трансмисија се сретнува најмногу во неразвиените земји и се однесува на пренесување на вирусот од мајка на дете во текот на бременоста, а најмногу при породувањето.

Најчесто инфекцијата со HBV е асимптоматска, а доколку се појават симптоми тие се развиваат после 60 – 90 дена од изложување на вирусот. Симптомите наликуваат на обична настинка, се јавува замор, општа болка, главоболка и висока температура над 38°C, проследено со губење на апетитот и тежината, дијареја, се чувствува болка во горниот десен дел на абдоменот, а по кожата и на белките од очите се јавува жолтило. Болеста може да биде со акутен или хроничен тек. Кај околу 60 – 70% инфицирани индивидуи со HBV, болеста не се манифестира, а доколку тоа се случи има амиктеричен и супклинички облик. Кај ваквите состојби, во околу 90% од случаите доаѓа до комплетно оздравување, а кај останатите поминува во хронично заболување кое може да остане во блага форма или да еволуира во животозагрозувачка болест.

Не постои специфична, а со тоа и 100% ефикасна терапија за лекување на хепатит Б. Кај 95% од случаите, имунолошкиот систем сам ја контролира инфекцијата и го елиминира вирусот, а остануваат само антитела како знак за преболена инфекција. Кај акутните инфекции се користи симптоматска терапија за регулирање на телесната температура, лекови против дијареја и повраќање. За лекување на хроничниот хепатит тип Б се препорачуваат анти-вирусни лекови, кои го намалуваат или спречуваат размножувањето на вирусот, а со тоа и оштетувањето на црниот дроб. За превенција од HBV се користи рекомбинантна вакцина произведена од квасец, во чиј геном е инкорпориран дел од геномот на HBV одговорен за кодирање на HBsAg. Во нашата земја е задолжителна вакцината против HBV, која се дава 24 часа по раѓањето.



Слика 7. Вакцина против HBV
Figure 7. Vaccine for HBV

1.4. Маркери на HBV

Прелиминарната дијагноза на хепатит тип Б се поставува врз основа на позитивни резултати на рутинските тестови за испитување на функцијата на црниот дроб – првенствено зголемени вредности на серумските трансминази и билирубин во крвта. Меѓутоа, антигените и антителата на HBV се од непроценливо значење за докажување на инфекцијата со HBV, како и утврдување на стадиумот и текот на болеста. Денеска на располагање се многубројни серолошки тестови кои се применуваат за потврдување на хепатит тип Б. HBsAg е првиот серолошки маркер за инфекција со HBV, кој е присутен во крвта неколку дена пред манифестирање на симптомите, иако постојат непотврдени податоци кои укажуваат на постоење на краток временски период на вирусот пред да се детектира HBsAg. Растворливиот HBeAg може да се детектира во серумот околу десеттиот ден после инфекцијата. Се смета за неверодостоен маркер за рана детекција на HBV, но бидејќи често е следен со високи концентрации на вирусот, претставува индикатор за висока инфективност. Две недели по појавата на детектибилни концентрации на HBsAg, во серумот се јавуваат антителата anti-HBc, кој претставува третиот маркер за инфекција со HBV и продолжува да перзистира со години, како кај акутен, така и кај хроничен облик на болеста. Кога станува збор за акутна инфекција, детектираниот HBeAg се губи, а се појавува специфичното антитело anti-HBe. По извесен период од околу два месеца опаѓа концентрацијата на HBsAg, како резултат на создавање на специфични антитела anti-HBs. Се смета дека појавата на овие антитела го означува почетокот на оздравувањето од инфекцијата. Отсуство на HBsAg во циркулацијата, зборува за заштитната улога на антителото anti-HBs и создава отпорност против HBV вирусот. Кај хроничните инфекции концентрацијата на HBsAg не се намалува, ниту пак се јавуваат антитела на anti-HBs. Се детектира присуство на антитела anti-HBc, но може да биде докажано и присуство на HBeAg. На крајот, вредностите на наведените маркери на HBV инфекцијата со текот на времето може да се намалуваат. Појавата на антителата anti-HBe може да послужи за понатамошна прогноза кај

хронично инфицираните, и нивното присуство во серумот укажува на поголем ризик од развој на хепатоцелуларен карцином (Тасески и сор., 1998).

Табела 1. Вообичаени серолошки наоди во текот на HBV инфекција
Table 1. Common serological results during HBV infection

	HBsAg	Anti-HBs	Anti-HBc	Anti-HBc IgM	HBeAg	Anti-HBe	DNA-HBV
Инкубациски период	+	-	-	(+)-	-	-	(+)
Акутна инфекција со HBV	+	-	+	+	+	-	+
Дамнешна инфекција со HBV	-	+	+	-	-	+/-	-
„Здрави“ хронични носители	+	-	+	-	-(+)	+(-)	-(+)
Перзистентен хепатитис	+	-	+	-(+)	-/+	+/-	-/+
Хроничен активен хепатитис	+	-	+	+/-	+/-	-/+	+/-

(+) Редок резултат

+ Позитивен наод

- Негативен наод

+/- Граничен наод

1.5. Ризик од трансфузиска трансмисија на HBV

Познато е дека трансфузијата на крв и крвни компоненти до неодамна претставуваше сериозен ризик за пренесување на HBV вирусот од дарител на примател. Меѓутоа денеска, со задолжително тестирање на секоја единица крв, со палета од серолошки анализи за маркери на хепатит од тип Б, ризикот е многу мал, скоро незначителен. Според податоци од литературата, само 1.4% од вкупно пријавените случаи на хепатит тип Б се смета дека се поврзани со трансфузија на крв. Паралелно со оваа информација е потврдено дека кај овие дарители сероконверзијата настанала после одредено време по дарувањето на крв и последователно на тоа, по тестирањето на крвта. Тоа се однесува на раната фаза од заболувањето т.н. „период на прозорец“, кога дарителот е инфициран со HBV, но HBsAg сè уште не може да се детектира во серумот. Денеска, покрај маркерите за докажување на хепатит тип Б, за откривање на присутна инфекција кај индивидуата се користи и PCR методата, со која се докажува присуство на циркулирачка DNA на HBV. Од досегашните истражувања постојат податоци дека DNA-HBV е детектирана кај многу индивидуи кај кои не е докажано присуството на другите маркери на инфекцијата со HBV или постоење на други индикатори кои укажуваат на хепатит тип Б. Меѓутоа, повеќето од истражувањата покажуваат и дека високата застапеност на DNA-HBV не е во директна пропорција со степенот за резидуален ризик за трансфузиска трансмисија со HBV. Поради тоа е потребна внимателна интерпретација на резултатите добиени со користење на PCR методата (Тасески и сор., 1998).

1.6. Мерки на претпазливост за превенција од HBV

Врз основа на анамнезата, клиничкиот преглед и лабораториските анализи, лекарот одредува дали поединецот ќе биде прифатен како дарител или ќе биде одбиен. Повеќето мерки за избор на безбеден дарител (без ризик за трансмисија на HBV) кои денеска се применуваат, се резултат на претходни истражувања чија цел била да се намали инциденцата од посттрансфузиски хепатит тип Б. Од посебно значење е исклучувањето на платени дарители и дарители од казнено-поправни институции, бидејќи се установило дека применувањето на нивната крв е следена со зголемен ризик за инфекција со HBV. Поради поврзаноста на интравенозното консумирање на дрога и инфекцијата со HBV, собирање податоци од потенцијалните дарители на крв и инспекција на кожата на подлактицата или други места за вбригување на дрога, исто така е од голема помош за препознавање и исклучување на ризични дарители. Корисни се и информации за претходни трансфузии, употреба на препарати со концентрирани фактори на коагулација или други парентерални изложувања и блиски контакти со индивидуи заболени од хепатит тип Б. Со оглед дека примената на HBIG (Hepatitis B immunoglobulin) за профилакса на инфекција со HBV може да го продолжи времето на инкубација на инфекцијата за повеќе од 6 месеци, потенцијалните дарители кои примиле HBIG треба да се исклучат од дарување на крв за наредните 12 месеци. Анамнезата и клиничката инспекција од страна на лекарот мора да бидат детални и темелни, со цел да се исклучат сите сомневања за постоење на периодот кога поединецот е носител на HBV, а не може да се детектира HBsAg со ниедна техника. Ова се однесува на потенцијалните дарители кои се инфицирани непосредно пред дарувањето, така што клиничката слика сè уште не е развиена, или индивидуи кои во минатото биле инфицирани со вирусот, а станале трајни носители на истиот, без оглед на клиничката слика на прележаната болест (Динић, 1966).

1.7. Тестирање на HBV со CMIA (Chemiluminescence immunoassay)

На Одделот за трансфузиона медицина при ГОБ „8-ми Септември“ – Скопје, секојдневно се врши предтрансфузиско тестирање на дарители и предоперативно тестирање на пациенти на маркери за HBV. Тестирањето се врши со автоматизиран анализатор за имунолошки анализи ARCHITECT i1000 sr. Со примена на хемилуминисцентна метода, се докажува присуството на HBsAg во човечки серум или плазма. Принципот на методата се базира на мерење на емитираниот зрак на светлина, кој настанува при хемиската реакција помеѓу две соединенија. Интензитетот на светлосниот сигнал е право пропорционален со количеството на присутен HBsAg во примерокот, кој се детектира во оптичкиот систем на апаратот и се мери во RLU (relative light units). Светлосниот сигнал се споредува со граничниот сигнал (cut-of control), одреден со активната калибрација. Доколку сигналот е појак или идентичен со граничниот се потврдува присуство на HBsAg и примерокот се смета за позитивен.



Слика 8. Автоматизиран анализатор ARCHITECT i1000 sr
Figure 8. Automatic analyzer ARCHITECT i1000 sr

За докажување на HBsAg се користи сет од три реагенси, кои се редат на еден носач и се аплицираат во апаратот.

- MICROPARTICLES – Реагенс кој содржи микрочестички обложени со anti-HBs антитела од глушец, суспендирани во MES пуфер со говедски серум албумин.
- CONJUGATE – Реагенс кој содржи anti-HBs од глушец и коза, обележани со акридиниум конјугат во фосфатен пуфер кој содржи човечка плазма и протеини.
- ANCILLARY WASH BUFFER – Помошен пуфер за перење содржан во MES пуфер.

Реагенсите треба да се чуваат во фрижидер, да не се користат по истекувањето на рокот, со секој нов лот (серија) да се прави калибрација и да се пушта позитивна и негативна контрола.



Слика 9. HBsAg реагенси
Figure 9. HBsAg regents



Слика 10. Контроли и калибратори за HBsAg
Figure 10. Controls and calibrators for HBsAg

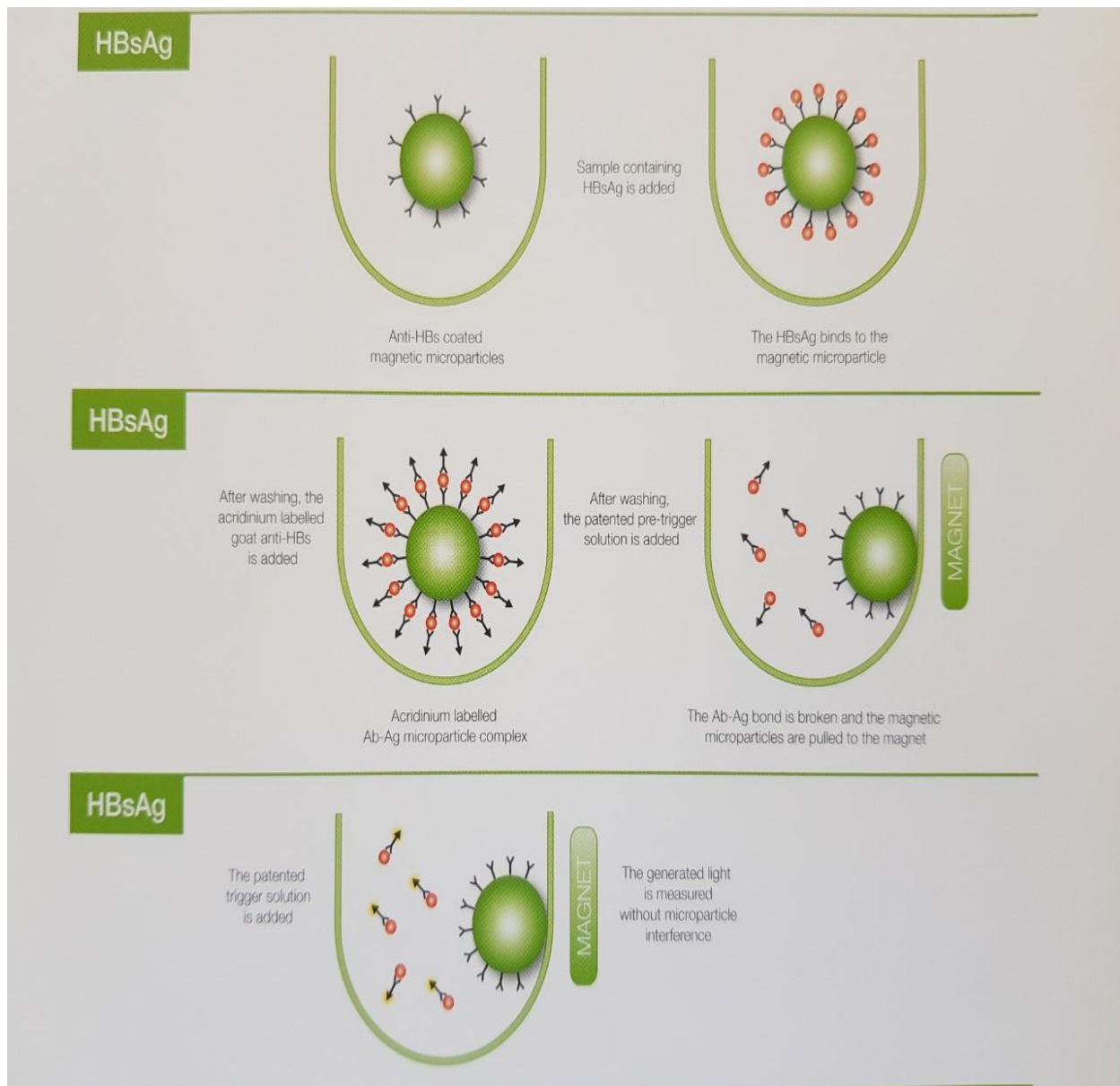
За одредување на HBsAg се користи свеж примерок на серум, кој се добива со центрифугирање на полна крв, 10 минути на 3600 вртежи. На специјални носачи се редат примероците, се задаваат нивните позиции, личните податоци за поединецот, и со бар-код детекторот се чита кодот на примерокот како потврда за бројот на носачот, позицијата и идентитетот на испитаникот, со што се исклучува можноста од грешки во преаналитичката фаза од страна на операторот.

Апаратот користи реактивни ќелии, каде што настануваат хемиските процеси помеѓу соединенијата и како резултат се генерира светлина која се мери со оптичкиот систем во самиот инструмент. Најпрво во реактивната ќелија се пипетираат микрочестичките обложени со антитела anti-HBs, на кои се додава испитуваниот примерок кој содржи HBsAg. Следи поврзување на HBsAg со антителата anti-HBs кои ги обложуваат микрочестичките.

По перењето се додава конјугат кој содржи anti-HBsAg антитела обележани со акридиум, при што се формира комплекс на микрочестички и обележани антиген-антитела со акридиум конјугат. Повторно следува перење со патентиран пре-тригер раствор со што настанува раскинување на врската помеѓу антителата кои ја обложуваат микрочестичката и антигенот, кој е пак соединет со обележаните антитела. Микрочестичката обложена со антителата е привлечена и се придвижува кон магнет (Слика 11).

Потоа се додава тригер раствор при што настанува генерирање на светлина која ја емитираат HBsAg од примерокот, соединет со обележаните акридиум антитела. Во интензитетот на светлината не учествуваат микрочестичките со обложени антитела, тие се привлечени од магнет и немаат никакво влијание врз резултатот (Architect system – проспект од производителот).

Покрај HBsAg, примероците се тестираат на HBeAg, anti-HBe, anti-HBc и anti-HBc IgM. Само примероците на дарителите, каде што сите маркери се негативни се прифаќаат за дарување на крв, а онаму каде што е детектирана и најмала концентрација на HBsAg (блиску до 1, кој се смета за негативен резултат), крвта се отстранува, а испитаниците се испраќаат на додатно испитување со PCR метода. Од досегашните повратни информации, кај незначителен број испитаници, со PCR методата не е докажана DNA-HBV во серумот, што укажува на тоа дека се јавуваат и лажно позитивни резултати. Но, преку конфирмативната PCR метода добиваме и потврда за големата сензитивност и специфичност на апаратот, која кај поголемиот број на примероци ја потврдува и најмалата концентрација за присуство на HBsAg онаму каде што е детектирана со CMIA. Овие сознанија ја зацврстуваат сигурноста на крвните единици и гарантираат безбедна трансфузија со крв и крвни компоненти без сомневање и ризик за инфекција со HBV.



Слика 11. Приказ на имунохемиска реакција кај CMIA
Figure 11. Presentation of immunochemical reaction of CMIA
 (преземено од ARCHITECT System)

1.8. Полимераза верижна реакција (PCR)

Откривањето на полимеразната верижна реакција од страна на Мулис (Mullis) во 1985 година, предизвика вистинска револуција во молекуларната биологија, за што на нејзиниот пронаоѓач му е доделена Нобелова награда за хемија во 1993 година. Засега нема друга техника со толкаво влијание врз молекуларно-биолошката методологија, каква што е PCR. Таа е незаменлива молекуларна алатка во истражувањата и дијагностиката на голем број наследни заболувања, неоплазми, инфективни болести, во базичната биологија, еколошките истражувања, во фармацијата, ветерината, земјоделието, како и други дисциплини.

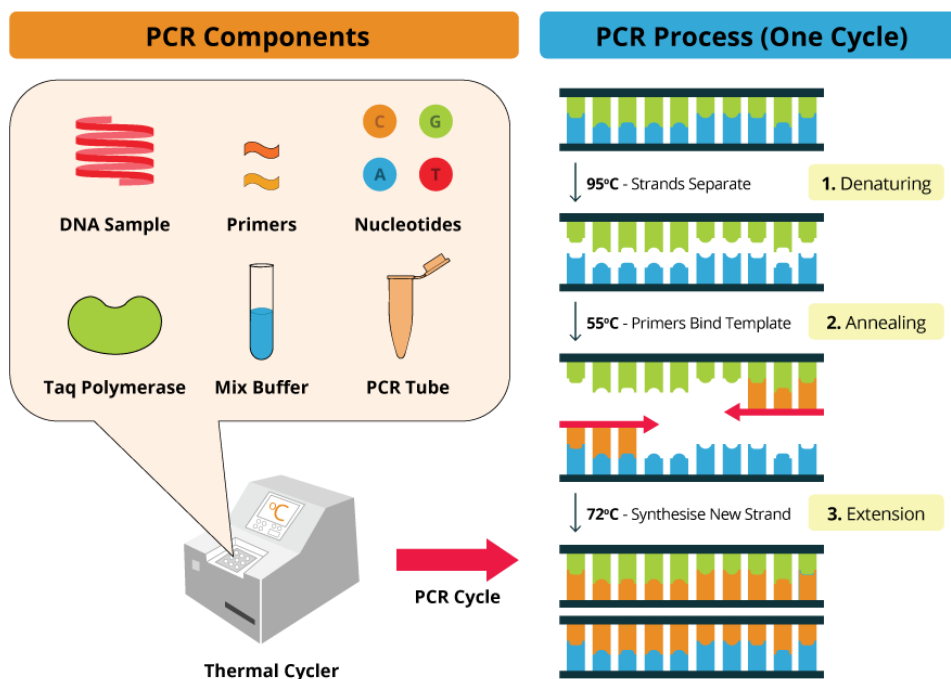
PCR се користи за умножување (амплификација) на DNA-секвенци од многу мало количество на испитуван биолошки материјал. Теоретски од само еден DNA молекул, со PCR можат да се добијат милијарди идентични DNA-копии означени како ампликони.

Според крајниот ефект, со PCR техниката се постигнува *in vitro* амплификација, односно еден вид молекуларно клонирање без клетки. Амплифицираната DNA понатаму може да се користи за различни молекуларно-генетски анализи, каква што е детекцијата на генски мутации и полиморфизми, или идентификацијата на микробиолошки агенси. PCR-амплификацијата е исклучително моќна техника со која може да се амплифицираат доволен број на DNA-молекули, за да бидат видливи при стандардна агарозна електрофореза, дури и кога почетниот материјал е само една или неколку клетки, влакно, или слично екстремно мало количество на биолошки материјал, кој содржи неколку молекули матичина DNA. Кај PCR-реакцијата се врши репетитивна, двонасочна ензимска синтеза на ограничени сегменти од DNA-молекулите. Ензимот кој учествува во PCR процесот е DNA Taq полимераза, која е резистентна на високи температури, а е изолирана од *Thermus aquaticus* што живее и се реплицира на температура од 95°C.

За започнување на DNA-полимеризацијата неопходни се куси иницирачки олигонуклеотиди – прајмери, а секој од нив мора да биде комплементарен со 5'

краевите од двете вериги на DNA-регионот кој се амплифицира. Тоа подразбира дека регионот е клониран и секвенциониран, или пак дека нуклеотидната секвенца е достапна од литературата или од базите на генски податоци на интернет (на пример, The Genome Database: <http://gdbwww.gdb.org/>). DNA-регионот кој се амплифицира е означен како ампликон и е ограничен со бочните секвенци на кои анилираат прајмерите.

Со рутинската PCR-техника можат лесно да се амплифицираат сегменти со должина од неколку стотици, па сè до неколку илјади базни пара. Постојат и посебни комерцијални сетови со рекомбинантни полимерази со кои е можна амплификација и на повеќе од 10 kb DNA-региони (Панов, 2014).



Слика 12. Приказ на компонентите и PCR процесот
Figure 12. Presentation of PCR process and components

За изведување на методата најпрво треба да се направи екстракција, односно изолација на DNA и нејзино прочистување. За таа цел постојат и готови китови за

изолација на DNA специфични за одредена анализа. За оваа постапка се користат дигестори.

Мастер-миксот кој е потребен за изведување на методата содржи:

- Пуфер – кој создава и одржува една постојана средина,
- Таq полимераза – која овозможува воспоставување на фосфодиестерски врски,
- Магнезиумови јони – претставуваат кофактори неопходни за активност на Таq полимеразата,
- dNTP – раствор со 4 нуклеотиди во еднаква концентрација кои претставуваат градбени единици и учествуваат во синтезата на новите вериги на DNA,
- Прајмери – кои претставуваат кратки секвенци од олигонуклеотиди, дизајнирани така да бидат комплементарни со секвенците на целниот регион од DNA кој сакаме да го умножиме,
- Стерилна дејонизирана вода,
- DNA од примерокот, добиена со претходна екстракција.

За амплификација се користат суви инкубатори – термосајклери кои овозможуваат прецизна промена на инкубациската температура за многу краток временски период.

Испитуваната DNA заедно со мастер-миксот кој ги содржи сите останати компоненти се ставаат во претходно означени PCR-епруветки кои се внесуваат во термосајклерот. Паралелно со нив се ставаат и контроли кои служат за да се потврди квалитетот на амплификацијата.

Потоа следи процесот со кој се врши денатурација на температура од 94°C при што настанува раскинување на водородните врски и раздвојување на двојната верига на DNA.

По завршувањето на овој процес температурата во термосајклерот се намалува на оптимална температура за прајмерите помеѓу 55°C и 60°C, при што започнува

фазата на анилирање, односно поврзување на прајмерите со секвенцата која ни е од интерес.

Наредната фаза се одвива на температура од 72°C и е наречена полимеризација што значи продолжување на веригата на DNA и нејзино комплетирање кое е овозможено од ензимот Таq полимераза.

Овие циклуси се повторуваат 35 пати и за неполни два часа се добиваат милиони копии од испитуваната секвенца.

Конвенционалната или end-point PCR е квалитативна метода со која се утврдува присуство или отсуство на HBV. За читање на резултатите се користи електрофореза, со што се докажува присуство или отсуство на вирусот.

PCR Real Time (PCR анализа во реално време) е побрза, посензитивна и поквалитетна метода во однос на класичната PCR, нема потреба од електрофореза, може да се мониторира во секој момент од процесот и има квантитативен карактер. Во мастер-миксот за PCR Real Time методата влегуваат и хибридизациони проби кои создаваат сигнал кој се детектира со ласер и се добива резултат со точен број на копии.



Слика 13. Термосајклер за PCR Real Time
Figure 13. Thermocycler for PCR Real Time

2. Цел на трудот

Основната цел на овој труд беше да се направи анализа на резултатите за маркери на HBV добиени со хемилуминисцентна метода – CMIA (Chemiluminescence immunoassay) и да се споредат со резултатите добиени со повторно тестирање на истите примероци со PCR методата. Акцентот беше ставен на детекција на HBsAg (Hepatitis B surface Antigen) во периодот на инкубација, рана и акутна фаза од инфекцијата, период кога оваа е првиот и единствениот серолошки маркер, кој се јавува во серумот, пред да се манифестираат симптомите на болеста.

Покрај ова, со PCR методата, која во случајов беше користена како втора, конфирмативна метода, ќе може да се потврди високата сензитивност на CMIA методата, но и да се потврди фактот дека иако ретко, се добиваат примероци со лажно позитивни резултати.

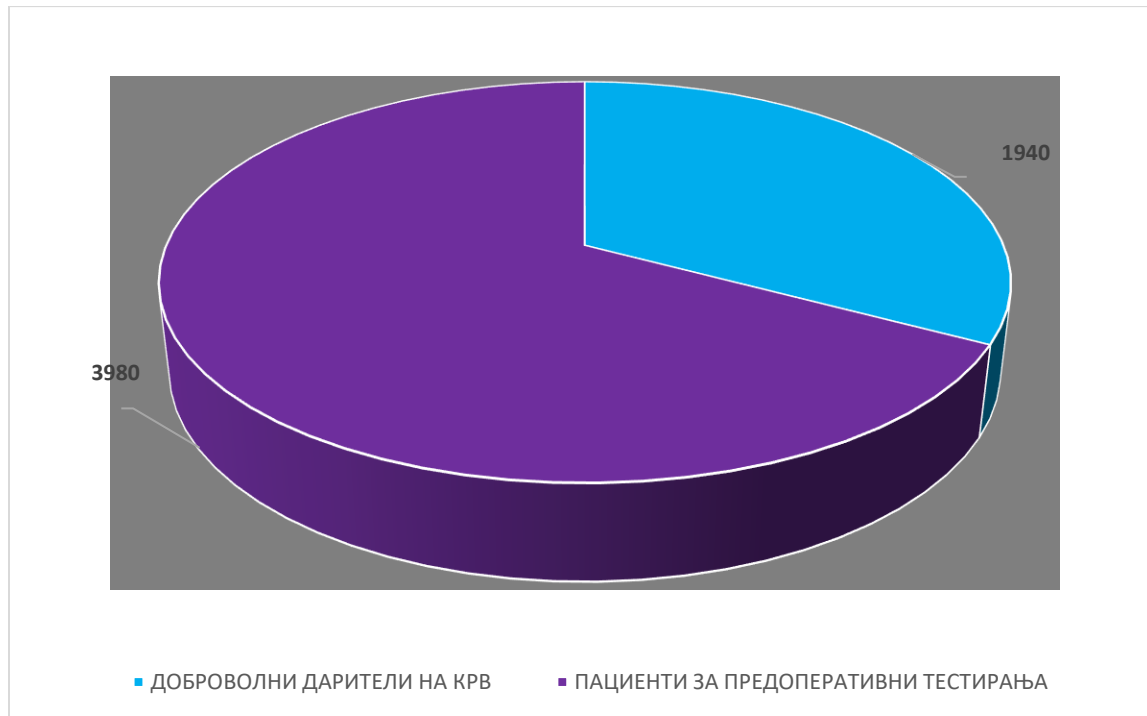
2. Пациенти и методи

Истражувањето беше направено во ГОБ „8-ми Септември“ – Скопје, при Одделот за трансфузиона медицина. Сите примероци кај кои е детектирано присуство единствено на HBsAg добиени од испитаници кои немаат симптоми и клиничка манифестација на болеста, се тестирани и со PCR методата. Во истражувањето се опфатени дарители кои доброволно се пријавиле да даруваат крв на Одделот за трансфузиона медицина при ГОБ „8-ми Септември“ – Скопје, во 2018 година. Во истиот период се опфатени и анализирани резултатите на пациенти кои се јавиле на Одделот за предоперативно тестирање за маркери на хепатит од типот Б. Кај сите испитаници како примерок за анализа е користен свеж серум, кој се добива со центрифугирање на полна крв, 10 минути на 3600 вртежи. Анализите се изработувани на автоматизиран анализатор ARCHITECT i1000 sr, со метода на хемилуминисценција, а како конфирмативна метода е користено молекуларно тестирање со PCR техника. Резултатите добиени од двете методи се анализирани и споредени, а на крајот резултатите од истражувањето се поткрепени и со податоци од достапна литература – современи учебници и научни трудови од Google scholar, PubMed, EMBASE и MEDLINE.

Со паралелната анализа на примероците, за детекција и рано откривање на HBV, при што беа користени две најсовремени техники со висока сензитивност, кај поголем број од испитаниците очекувањата беа да се добијат идентични резултати, односно резултатите кои ќе се добијат со методот на хемилуминисценција, да бидат потврдени со PCR методата. Но, постоеја очекувања дека кај мал број на примероци, ќе се јави извесно отстапување на резултатите, односно примероците кај кои ќе биде докажан позитивитет со хемилуминисценција, истиот да не биде потврден со PCR методата, што укажува на тоа дека понекогаш се добиваат лажно позитивни резултати.

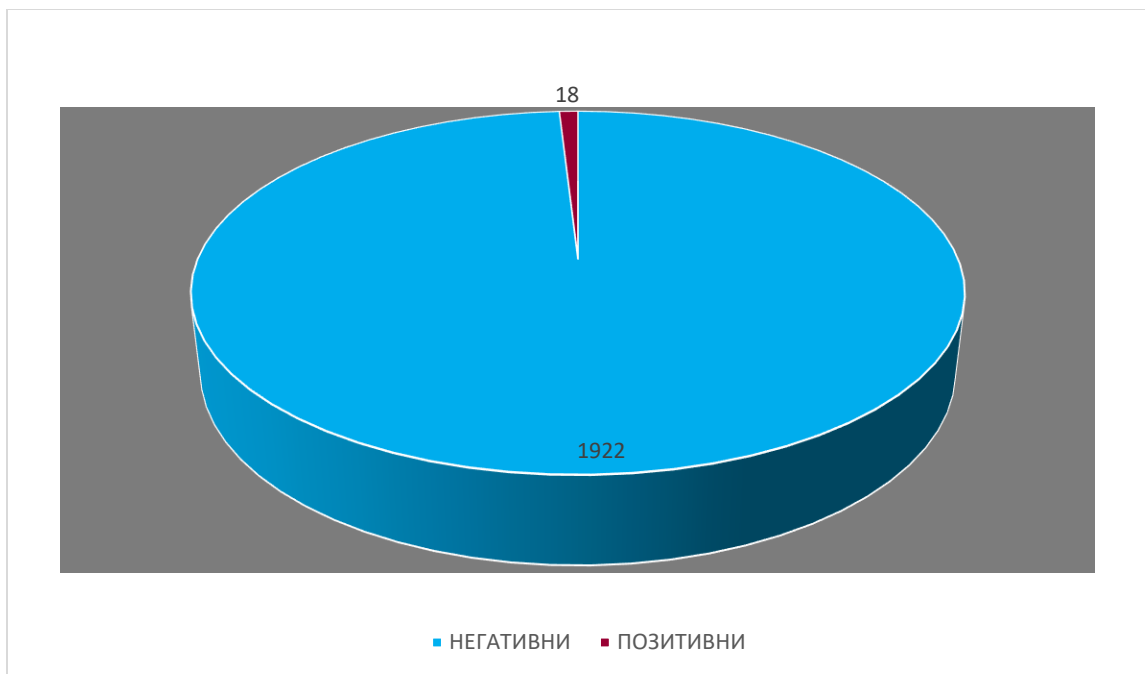
3. Резултати и дискусија

Во периодот од јануари до декември 2018 година на Одделението за трансфузиона медицина беа тестирани вкупно 5920 лица, од кои 1940 беа доброволни дарители на крв, а 3980 пациенти за предоперативни испитувања.

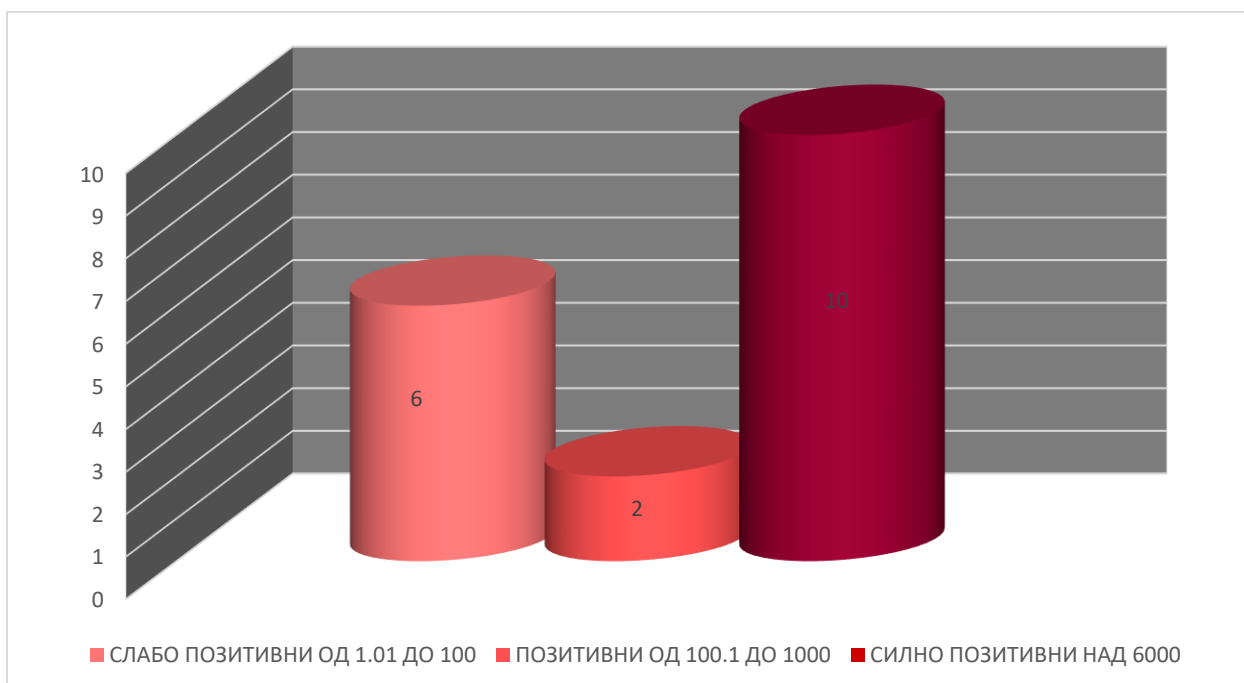


Слика 14. Број на тестирани лица на маркери на HBV во 2018
Figure 14. Number of tested persons for markers of HBV in 2018

Од вкупно 1940 доброволни дарители на крв, кај 18 е детектирано присуство на HBsAg. Кај 10 од нив се добиени резултати со силно позитивни вредности, кај двајца резултати со средна измерена вредност, а кај шест од нив се добиени резултати кои се многу блиску до референтната вредност која изнесува <1 , како на пример 1.13; 1.11; 1.39 и сл.



Слика 15. HBsAg кај доброволни дарители на крв
Figure 15. HBsAg in voluntary blood donors



Слика 16. Дистрибуција на позитивните крводарители според RLU
Figure 16. Distribution of positive blood donors according to RLU

Кај сите 18 позитивни крводарители е направена квантитативна анализа во серум со PCR Real Time метода и кај 16 е потврдено присуството на HBsAg, освен кај двајца, кај кои се добиени негативни резултати. Интересен е фактот дека негативни резултати со PCR метода се добиени кај крводарителите со многу силен позитивитет, како и фактот дека се потврдени сите позитивни примероци кај кои е детектирано многу ниско присуство на HBsAg и кои се многу блиску до референтната вредност. Од овие резултати се потврдува високата сензитивност на CMIA со ARCHITECT i1000sr, но се добиваат и информации кои водат кон специфичноста на методата, која исто така е на многу високо ниво. Имено само два примерока се незначителен репрезентативен број за анализа, но секако посочуваат на тоа дека од досега недоволно истражени и неразјаснети причини кај одредени индивидуи се добиваат силно позитивни резултати, а во серумот немаат HBsAg. Размислувањата најпрво се движеа во правец кон моментални интра или екстра нарушени услови во работната околина на апаратот, кои можат да влијаат врз работниот процес. Потоа, можност на контаминација на примерокот, реагенсите или реактивните ќелии, кои во голема мера може делуваат врз точноста на резултатите. Од технички аспект, грешки кои може да настанат при детекција и мерењето на сигналот и на крајот секако човечка грешка. Но, со повторување на истите примероци, при што се добиени истите резултати, преку кои се потврди и прецизноста на методата, сите претходни размислувања беа отфрлени. Се создадоа претпоставки, во однос на индивидуите кај кои се добија лажно позитивни резултати, размислувања кои не се докажани и за кои ќе треба во иднина преку поголем број на примероци дополнително да се направат анализи. Идејата е секој поединец со лажно позитивни резултати да пополни прашалник со прашања преку кои би добиле подетален увид во неговиот начин на исхрана, користење суплементи или други диететски производи, алкохол, претходно прележани болести, алергии, да се направат биохемиски анализи и други испитувања. Целта ќе биде да се дојде до сознание дали кај овие индивидуи серумот одредени причини се разликува како медиум за анализа, од серумот на останатите испитаници, што предизвикува поврзување со обележаните антители и

создава хемиска реакција, чиј интензитет е детектиран и измерен од страна на инструментот, а резултира со лажно позитивни резултати.



Слика 17. Позитивни дарители на HBsAg во серум тестирани со CMIA метода
Figure 17. Positive HBsAg donors, serum tested with CMIA method

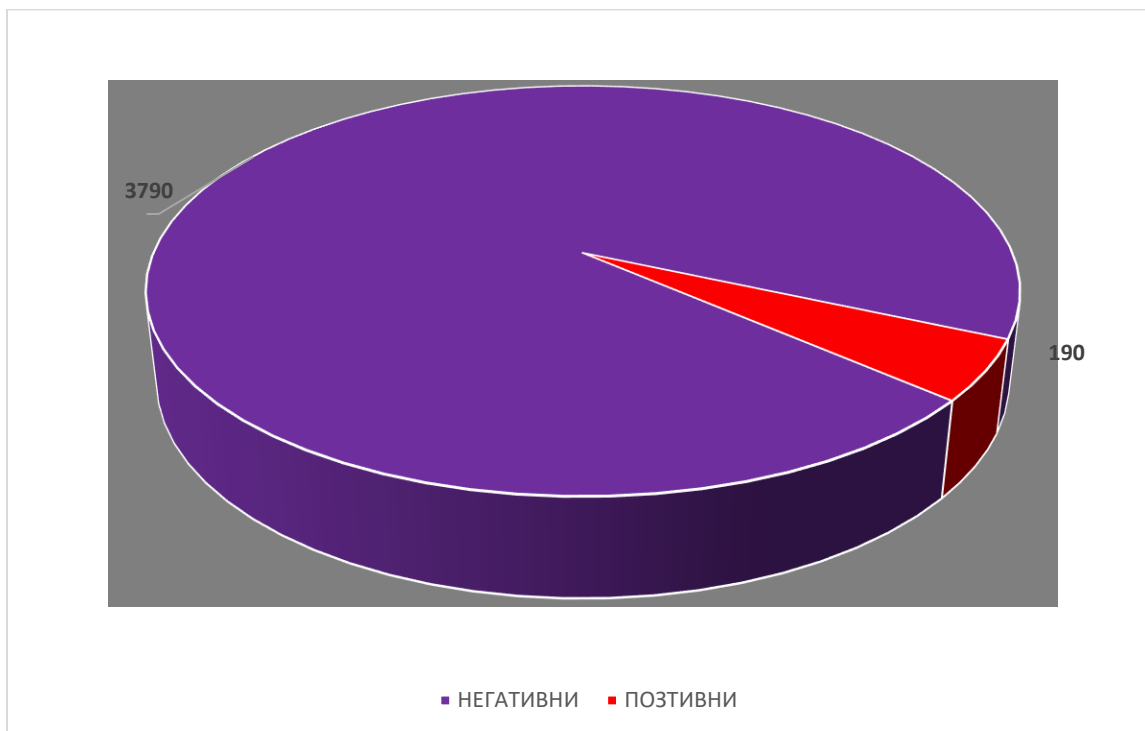


Слика 18. Позитивни дарители на HBsAg во серум тестирани со PCR - Real Time метода

Figure 18. Positive HBsAg donors, serum tested with PCR – Real Time method

Во однос на пациентите за предоперативно тестирање, од вкупно 3980, како позитивни носители на HBsAg беа детектирани 190, меѓу кои се вбројуваат:

- Пациенти со акутен хепатит,
- Пациенти со хроничен хепатит,
- Пациенти во инкубационен период,
- Пациенти со лажно позитивни резултати.



Слика 19. HBsAg кај пациенти за предоперативно тестирање
Figure 19. HBsAg in patients for preoperative testing

Со оглед на тоа дека некои од пациентите ги продолжуваат своите испитувања во други здравствени установи, не може точно да се утврди кај колку од нив за првпат и сосем случајно е детектирано присуство на HBsAg. Поради тоа не може да се направи споредба на резултатите кои се добиени со PCR методата, бидејќи се направени само кај дел од нив. Но, и покрај тоа, од резултатите кои беа на располагање, можеше да се забележи, дека покрај потврдените позитивни

примероци со PCR методата, постојат и примероци кај кои не е детектирано присуство на HBV, односно лажно позитивни резултати. Овие лажно позитивни резултати во ниеден момент не ја оспоруваат сензитивноста CMIA методата, но секако заслужуваат поголемо внимание, во иднина да бидат предмет и основа на понатамошни анализи и истражувања од пошироки размери, преку кои би добиле одредени сознанија од кои фактори и причини настанува отстапување на резултатите.

5. Заклучоци

1. Иако е многу мал, речиси незначителен, ризикот од трансфузиско-трансмисивен хепатит тип Б сè уште постои. И покрај современите имуно-ензимски методи кои имаат висока сензитивност и специфичност, секогаш постои можност во раната фаза на инфекцијата истата да не може да се детектира. Затоа сè уште се работи во правец на пронаоѓање уште посоефицирани методи и техники за рано откривање на инфекција со хепатит тип Б, во периодот кој е наречен „прозор“, кога и најчесто се случува да се провлечат случаи кои се инфицирани, а немаат детектибилни антигени во серумот.
2. Од ова истражување, со PCR методата која беше користена како втора конфирмативна метода, се потврди високата сензитивност на хемилуминисцентната метода, како и фактот дека иако ретко, понекогаш може да се добијат различни резултати со двете методи. Со паралелна анализа на примероците, кај повеќето испитаници се добија идентични резултати, односно беше потврдено присуството на HBsAg со PCR методата, кое претходно беше докажано со хемилуминисцентната метода, но се добија и резултати кај кои со PCR методата не беше потврдено присуството на хепатит вирус тип Б. Тоа значи дека од досега недоволно истражени и разјаснети причини понекогаш се јавуваат „лажно“ позитивни резултати при тестирање на примероците со хемилуминисцентна метода, што укажува на внимателно интерпретирање на резултатите кај здрави испитаници, како и потребата од подлабока анализа на тие резултати и причините кои доведуваат до појава на истите.
3. Во правец на дарителите, се преземаат построги мерки при нивната селекција, со зголемена внимателност при земањето на анамнеза и клиничка инспекција. Исто така здравствената култура, моралот и етиката кај потенцијалните дарители се од голема важност за отстранување на ризикот од посттрансфузиски хепатит со искрено одговарање на прашањата

што ги поставува лекарот при земање на анамнезата, без оглед колку се тие компромитирачки. Потребно е да се работи на подигање на свеста на секој крводарител и преку информативни кампањи, програми и печатени информатори, да се запознаат колку може да допринесат со дарувањето на крв, но и за несаканите последици за примателите и за себе доколку не одговорат точно на прашалникот или притаат некои битни факти.



Слика 20. Пропаганда за крводарување
Figure 20. Propaganda for blood donation

6. Користена литература

1. Благоевска, М. и Макаровска - Бојаџиева, Т. (2014). Трансфузиската медицина во лабораториската и клиничката практика. Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Медицински факултет, Скопје; 60.
2. Динић, Б. (1966). Трансфузија крви. Савезни завод за здравствену заштиту Београд; 412-415.
3. Панов, С. (2014). Основи на молекуларна биологија и генетика. Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Природно-математички факултет, Скопје; 456.
4. Стоилова, С. (2010). Епидемиологија. Висока здравствена школа, Битола.
5. Тасески, Ј. и Балинт, Б. (1998). Трансфузијски-трансмисивне вирусне инфекции. Београд; 24-39.
6. ARCHITECT System – проспект од производителот.
7. Прирачник за подготовка, користење и обезбедување на квалитет на крвни компоненти. 5-то издание. Издава Советот на Европа (1998).
8. Liu C, Chang L, Jia T, Guo F, Zhang L, Ji H, Zhao J, Wang L. (2017). Real-time PCR assays for hepatitis B virus DNA quantification may require two different targets. *Virology*. May 12;14(1):94.
9. Tu T, Budzinska MA, Shchel NA, Urban S (2017). HBV DNA Integration: Molecular mechanisms and Clinical Implications. *Viruses*. Apr 10;9(4).
10. Хепатитис Б тестирање
http://manu-icgib.mk/Upload/dokumenti/HBV_ICGIB_mak.pdf