

**ОБОБЩЕН ОТЧЕТ ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕТО НА
НАЦИОНАЛНАТА НАУЧНА ПРОГРАМА
„СЪЗДАВАНЕ НА БАЗА ДАННИ НА КРЪВОДАРИТЕЛИТЕ В РЕПУБЛИКА
БЪЛГАРИЯ ЗА МАРКЕРИ НА ТРАНСМИСИВНИ ИНФЕКЦИИ“**

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Опазването на здравето на гражданите е национален приоритет и всеки пациент има право на качествени грижи, основаващи се на високи професионални стандарти. Основна цел, която трябва да бъде постигната от всяка Национална трансфузионна система по отношение сигурността на кръвта е предпазването от предаване чрез кръвта и кръвните продукти на човешките имунодефицитни вируси (HIV-1 и HIV-2), на вирусните причинители на хепатити тип В (HBV) и тип С (HCV) и на други инфекциозни агенти.

Националната политика за скрининг на дарената кръв в България се определя от епидемиологичната обстановка, препоръките на международните институции и по специално от Директивата на Европейския съюз и препоръките на Съвета на Европа, като и от наличните ресурси за здравеопазване. Ефективната и добре организирана Национална програма за скрининг на донорска кръв, заедно със системите за качество са жизнено необходими за снабдяването на пациентите с безопасна и качествена кръв и в обеми, достатъчни за покриване на потребностите им.

Модерната лабораторна диагностика се характеризира с развитие на нови и усъвършенстване на известни методи и техники. Ключови показатели за лабораторната диагностика са чувствителността и специфичността на методите за идентифициране на инфекциозни агенти. Към момента в България, всяка единица взета кръв се изследва задължително за анти HIV 1 и 2 антитела, повърхностен антиген на хепатит В, анти HCV антитела и антитрепонемни антитела.

NAT технологията (Nucleic Acid Testing - техника за амплификация на нуклеиновите киселини) за диагностика на дарената кръв в трансфузионната система в Република България бе въведена в рутинната практика на кръвните центрове в страната от началото на 2020 г., благодарение на приключилата вече Национална научна програма „Разработване на методология за въвеждане на NAT технология за диагностика на дарената кръв в трансфузионната система на Република България“. NAT тестването е най-новата в световен мащаб технология за диагностика на донорската кръв за вирусните причинители на хепатит В (HBV) и хепатит С (HCV), на вируса на придобития имунодефицит (HIV) и на други опасни вируси с висока вирулентност и инфекциозност. Основното преимущество на новата технология е скъсяване на т.н. „прозоречен период“ (времето от заразяването на донора до момента на установяване на тази инфекция в донорската кръв), което пряко влияе върху повишаването на качеството и безопасността на кръвта и кръвните съставки.

С решение на Министерски съвет № 262/21.04.2020 г. е одобрена **Национална научна програма (ННП) „Създаване на база данни на кръводарителите в Република България за маркери на трансмисивни инфекции“**. Основна цел на програмата е систематичното събиране и обобщаване на информация за разпространението на маркерите на трансмисивните инфекции HBV, HCV, HIV сред кръвните донори в България за научни цели и изграждане на точна картина относно епидемиологичната обстановка в страната както и обработване и анализиране на сравнителните данни от диагностиката с използвания понастоящем серологичен метод и с молекулярния метод NAT по отношение на броя установени инфекции.

С изпълнението на националната научна програма се извърши паралелно изследване на

донорската кръв по двата метода - серологичен и молекулярен, което даде възможност за събиране на информация относно разпространението и честота на вирусите на HIV, хепатит В и хепатит С сред донорите в страната за период от три последователни години. Чрез анализ на резултатите, получени чрез тези два метода, ще се осъществи създаването на база данни за разпространението на маркерите на трансмисивните инфекции сред здрави лица - донори на кръв, както и възможност за обобщаване на данните по брой, пол, възраст и тип кръводарители.

В настоящия анализ на данните от проведените изследвания е оценена ролята и ползата от въвеждането на NAT-технологията за редуциране на риска при преливане на кръв от предаването на трансмисивни инфекции в сравнение със стандартните серологични методи.

2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

В периода на изпълнение на програмата 2020-2022 г. бяха проведени изследвания на 120 000 здрави донори на кръв от 6 изследователски екипа - един от Национален център по трансфузионна хематология - София и пет от медицинските университети в градовете София, Пловдив, Стара Загора, Плевен и Варна. Диагностиката на донорската кръв за трансмисивни инфекции в центровете по трансфузионна хематология (ЦТХ) се осъществи чрез серологични тестове за скрининг- имуноензимен метод ELISA и метод на хемилуминесценция CLLA. Чрез тези методи се откриват антитела срещу вируса на придобития имунен дефицит (HIV- HIV1+HIV2 - Ag/Ab), на хепатит В (HBV- HBsAg), на хепатит С (HCV Ag/Ab). Използваната е NAT-технологията. За целта се ползваше рутинен режим на работа е Procleix Panther System за изследване на проби от дарена кръв за маркери на трансмисивни инфекции с тестовете Procleix Ultrio Elite и Procleix Ultra Elite HIV, HCV и HBV дискриминаторни тестове, който включва три основни стъпки в една епруветка: 1/ подготовка на пробата - целево улавяне със специфични олигонуклеиди; 2/ Транскрипционна медирана амплификация; 3/ Засичане на амплификационните продукти чрез хибридизация на комплементарни олигонуклеидни секвенции (сонда).

В тригодишния период на проведеното проучване изследваните 120 000 здрави донори са на възраст от 18 до 70 години. От всички кръводарители 29 630 са жени и 90 370 са мъже. Средна възраст на кръводарителите - 38,43 години. Най-много проби са изследвани в Район София – 30 571 и НЦТХ-София – 13 367, следвани от Район Пловдив – 19 850 и НЦТХ Пловдив – 8 234, Район Плевен – 11 223 и ЦТХ Плевен – 5 275, Район Варна – 10 744 и ЦТХ Варна – 5 253, Район Стара Загора – 10 069 и ЦТХ Стара Загора – 5 414. За анализ към основните центрове са получени проби още от ОТХ в Ямбол, Шумен, Хасково, Търговище, София област, Смолян, Сливен, Силистра, Русе, Разград, Перник, Пазарджик, Лом, Ловеч, Кюстендил, Кърджали, Добрич, Габрово, Враца, Видин, Велико Търново, Бургас, Благоевград.

3. РЕЗУЛТАТИ

Сравнителен анализ на резултатите от двата вида изследване (серологично и NAT) за HIV на база данните от донорите на 120 000 единици дарена кръв

На таблица 1 са въведени данните от резултатите от направените изследвания за НТВ по методите ELISA/CLIA, като таблицата включва само положителните (отбелязани с 1) и реактивните проби (отбелязани с 2), представени като абсолютни бройки.

HIV ELISA/CLIA

Табл. 1. Резултати от проведените изследвания със серологични методи

	2020	2021	2022	Общо
Жени				
Положителен (1)	3	4	5	12
Реактивен (2)	6	14	8	28
Общо жени	9	18	13	40
Мъже				
Положителен (1)	5	6	14	25
Реактивен (2)	14	25	40	79
Общо мъже	19	31	54	79
Общо жени и мъже	28	49	67	144

При направените изследвания с ELISA-HIV се установяват общо 37 положителни и 107 реактивни проби. От получените резултати-12 положителни и 28 реактивни проби са на донори жени, докато при мъжете положителен резултат е отчетен при 25 и реактивен при 79 от изследваните донори.

Броят на положителните и реактивните проби е относително константен при жените за трите години на проучването и не показва определена тенденция относно честотата на разпространение, докато при донорите от мъжки пол се отчита тенденция към нарастване както на положителните проби, така и на реактивните на третата година от проучването.

Резултатите от проведените изследвания за HIV за тригодишния период с NAT технологията (табл.2), установяват 141 положителни проби и 408 реактивни резултата. Положителните резултати от проведеното изследване са най-високи през първата година на проучването и намаляват значително през последвалите 2 години, като през последната година не установява положителна проба при жените, но се наблюдава нарастване на реактивните проби на 169, при 111 на първата година. При мъжете се отчита висок брой положителни проби – 92, както и реактивни – 99 през първата година от проучването.

Сравнителен анализ на резултатите от двата вида изследване (серологично и NAT) за HCV на база данните от донорите на 120 000 единици дарена кръв

**Табл. 2. Резултати от проведените изследвания с NAT
HIVNAT**

	2020	2021	2022	Общо
Жени				
Положителен (1)	27	3	0	30
Реактивен (2)	12	32	36	80
Общо жени	39	35	36	110
Мъже				
Положителен (1)	92	14	5	111
Реактивен (2)	99	96	133	328
Общо мъже	191	110	138	439
Общо жени и мъже	230	145	174	549

Табл. 3 Резултати от серологично и NAT изследване за HCV

Период	ELISA/CLIA(+)	NAT (+)	NAT (+)ELISA/CLIA (-)	NAT (+) ELISA/CLIA (неопределен)
03-10.2020	49	131	106	7
09.2020 - 05.2021	45	31	14	3
08.2021 - 04.2022	54	20	-	2
Общо:	148	182	120	12

За целия 3-годишен период (табл. 3), са установени при 148 единици кръв антитела срещу HCV чрез ELISA/CLIA, а в 182 случая се доказва вирусната РНК чрез NAT. От позитивните по NAT в 120 единици кръв не се откриват антивирусните антитела (anti-HCV), а при други 12 резултатът е неопределен. Обобщено, при 132 единици кръв, при изследване само със серологични методи и без NAT, е бил налице риск от пропускане детекцията на хепатит С вируса и преливане на инфектирана кръв.

Известно е, че „прозоречният период“ при хепатит С е доста дълъг - 4-6 седмици, в редки случаи дори до 6 месеца. През този период антивирусните антитела не се откриват, но индивидът е заразен и може да разпространява вирусът чрез кръвта си. От др. страна вирусната РНК може да бъде открита чрез PCR или други NAT методи на 2-3 седмица след експозицията. Следователно NAT скъсява „прозоречният период“ на хепатит С вируса и приложението му в хемотрансфузионните центрове прави донорската кръв много по-сигурна в сравнение с използването само на серологични методи (ELISA и CLIA). Същевременно е необходимо да се има предвид, че при хроничната хепатит С инфекция времето е флукутираща и еднократното изследване би могло да я пропусне, необходимо е неколккратно тестване в течение на 1 година. По този начин търсенето на антитела остава важен метод в комплексната диагноза на хепатит С, като с NAT технологията взаимно се допълват.

Сравнителен анализ на резултатите от двата вида изследване (серологично и NAT) за HBV на база данните от донорите на 120 000 единици дарена кръв

Таблица 4. Сравнителни данни за броя на положителните проби за Hepatitis B virus при изследване с ELISA/CLIA и NAT технология на 120 000 единици дарена кръв

ELISA/CLIA	NAT	Брой положителни
+	+	288
-	+	97
Reactive	+	62
+	-	36
+	Reactive	126

Hepatitis B virus (табл. 4) беше доказан при 450 единици дарена кръв при изследване със серологичните методи и при 447 единици кръв при изследване с НАТ. При 288 единици кръв HBV се доказва едновременно с двата метода, при 162 само със серологичните методи и при 159 само с НАТ.

В проучването HBV ДНК-положителни са 447 (0,37%) от всички кръводарители, което е в съответствие с данните от проучване върху над 10 млн. донори от различни региони в света. Регионалната честота на HBV детекцията варира от 0.08% до 1.07%. При изследване с НАТ се установи положителен резултат за HBV ДНК при 159 единици кръв, които са отрицателни за HBsAg. Следователно, внедрената НАТ технология за тестване на дарената кръв в хемотрансфузионните центрове в страната за този период от време е допринесла за предотвратяване на кръвопреливане на общо 159 единици кръв инфектирани с Hepatitis B virus.

Известно е, че инфекцията с Hepatitis B virus се характеризира с персистиране на ниско ниво на вирусния и липса на HBsAg в серума т.н. прозоречен период. От друга страна, при окултния хепатит В се наблюдава персистиране на вирусния геном в черния дроб и кръвта при липса на HBsAg в серума. Въвеждането на НАТ технологията редуцира прозоречния период от 32 на 15 дни и позволява детекция на пациенти с окултна HBV инфекция. Тъй като тези кръводарителите не са тествани за anti-HBc и anti-HBs е трудно да се прецени дали HBV ДНК положителните/HBsAg отрицателните резултати са асоциирани с ранна фаза на инфекцията или с окултен хепатит В.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Повече от три десетилетия светът живее с глобалното предизвикателство за справяне с епидемията, причинена от ХИВ. Географското положение на България поставя страната на кръстопътя на две епидемии от ХИВ/СПИН с различна динамика и различни движещи сили. От една страна епидемията в Западна и Централна Европа с приблизително 900 000 лица, живеещи с ХИВ и от друга в Източна Европа и Централна Азия, един от трите региона в света с разрастваща се епидемия, с около 1 700 000 милиона лица, живеещи с ХИВ.

Вирусните хепатити са най-масовото, глобално разпространено инфекциозно заболяване. В света над 2 млрд. хора са преболедували от остър вирусен хепатит. Вирусните хепатити Б и С засягат 325 милиона души в световен мащаб и изискват особено внимание от здравните системи. Парентерално предаваните хепатотропни вируси предизвикват хронична форма на инфекцията, така че инфектираните индивиди стават постоянни източници на заразяване в човешката популация. Предполага се, че има 226 хиляди българи, заразени с хепатит В, и 87 хиляди - с хепатит С.

Голямото здравно и социално значение на вирусен хепатит тип В (ВХБ) се определя от факта, че над 240 милиона са хронични носители в света, от които всяка година около 1 милион умират от цироза и хепатоцелуларен карцином. Хепатитния В вирус е един от най-устойчивите на външни условия вирус – издържа продължително време на топлина, замразяване, резистентен е и на повечето дезинфектанти. Парентералното заразяване с вирусен хепатит В чрез преливане на кръв и кръвни продукти е известно от 1950 г. При попадането директно в кръвта хепатитния В вирус проявява изразен тропизъм към паренхимните клетки на черния дроб. Хепатитният В вирус не е директно цитопатичен и предизвиканото чернодробно увреждане се развива по типа на имуномедираната цитотоксичност.

Нивото на разпространение на HBV инфекция в България поставя страната в зоната на средна ендемичност. Носителство на HBsAg се доказва средно при 3 до 5% от населението на страната. В резултат на масовата имунизация на всички новородени, заболяемостта при лица, родени след 1992 г., които са имунизирани е снижена рязко в сравнение с доимунизационния период.

Хепатит С вирусната инфекция е типична кръвно-преносима инфекция, като предаването ѝ с други телесни течности е далеч по-неефикасно в сравнение с HBV. Основна рискова група са лицата, получавали кръв и кръвни продукти преди 1990 година.

Тежките медицински и социални последици от тази инфекция заостриха вниманието на много правителства в Европа и по света, разработени и приети бяха национални програми и планове за борба със вирусните хепатити. Програмата за нашата страна е със срок на действие от 2021 до 2025 г. и има заложен няколко цели: Да бъде намалена заболяемостта от вирусни хепатити с 45% до 2025 г. (90% през 2030 г.), да бъде намалена смъртността от вирусни хепатити с 30 % до 2025 г., да бъде достигнато и задържане ниво от 95% обхват с трети прием на ваксина срещу хепатит В при деца, да бъде елиминиран вертикалният механизъм на предаване на вируса на хепатит В от майка на дете. NAT технологията за скрининг на кръводарители е високо чувствителна и специфична за вирусни нуклеинови киселини и се базира на амплификация на генома на вирусна РНК и ДНК. Въвеждането на NAT технологията в рутинната практика на трансфузионните центрове в България подобрява значително вирусната безопасност на кръвопреливането, увеличава се възможността за детекция на прозоречния период и се намалява остатъчният риск от предаване на инфекциозни заболявания чрез кръвта и кръвните съставки. NAT технологията има потенциал за детекция на вирусите по-рано в сравнение с методите за скрининг, които се базират на сероконверсия. Като количествен показател за безопасност на дарената кръв определянето на остатъчният риск от пренасяне на инфекциозни заболявания (остатъчен риск от предаване на трансмисивни или кръвно преносими инфекции), позволява да се извърши мониторинг на безопасността на донорската кръв и да се оцени ефективността на използваните нови методи за лабораторен скрининг на кръвта.

Величината на остатъчният риск от предаване на трансмисивни инфекции е в пряка зависимост от чувствителността на лабораторните методи. Остатъчният риск от предаване на кръвно преносими инфекции е свързан главно с инфектирането на кръвни съставки, подготвени през прозоречния период и съответните лъжливо-отрицателни резултати от лабораторния анализ.

С въвеждането в България на NAT за диагностика на кръвта за маркери на трансмисивни инфекции и успоредното и използване със серологичните методи имат за последица нисък остатъчен риск от предаване на трансмисивни инфекции при кръвопреливане.

5. ОБОБЩЕНИ ДАННИ ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕТО НА ИНДИКАТОРИТЕ ПО ПРОГРАМАТА:

Индикатор:	Целева стойност:	Резултат:
Сформирана работна група от 6 изследователи за разработване на ННП „Създаване на база данни на кръводарителите в Република България за маркери на трансмисивни инфекции“		Със Споразумение от 03.09.2020 г. е формирана работна група от 6 изследователи, 1 от НЦТХ и 5 от Медицинските университети в градовете София, Пловдив, Стара Загора, Плевен и Варна.
Закупени реактиви и консумативи, необходими за извършването на изследвания на донорска кръв за вирусите на HIV, хепатит Б и хепатит С по молекулярния метод NAT	<ul style="list-style-type: none"> • За 2020 г. – за 40 000 бр. изследвания; • За 2021 г. – за 40 000 бр. изследвания; • За 2022 г. – за 40 000 бр. изследвания. 	Сключен договор и приемо-предавателен протокол за доставка, съгласно които са закупени и доставени реактиви и консумативи:

		<ul style="list-style-type: none"> • За 2020 г. – за 40 000 бр. изследвания; • За 2021 г. – за 40 000 бр. изследвания; • За 2022 г. – за 40 000 бр. изследвания.
Извършени анализи и сравнителни проучвания относно разпространението и честотата на вирусите на HIV, хепатит Б и хепатит С сред донорите в България в сравнение с предходни периоди	За всяка година от програмата	За трите години са представени общо 18 бр. доклади от изследователите относно анализи, свързани с трансмисивните инфекции на основата на предоставените данни от извършените 120 000 бр. изследвания с закупените реактиви. Базата данни от трите години /анонимизирана/ може да бъде предоставена за ползване с научни цели и за в бъдеще.
Участие в научни форуми (конференции, конгреси, кръгли маси, събеседвания и др.) за популяризиране на постигнатите резултати	По 1 научен форум за всяка година от програмата	<p>2020 г. 01.12.2021 г., Онлайн-събеседване на специалисти по трансфузионна медицина</p> <p>Тема: <u>„Ковид пандемията и нейното отражение върху броя на кръводарителите и разпространението на трансмисивните инфекции в страната”</u></p> <p>2021 г. 24-26.09.2021 г., гр. Варна I-ва Научна конференция по трансфузионна хематология</p> <p>Теми: <u>„Въвеждане на НАТ тестването като рутинна практика в трансфузионната система”</u></p> <p><u>„Предизвикателства в диагностиката на трансмисивни инфекции</u></p>

		<p><u>в трансфузионната система</u></p> <p>2022 г. 19.05.2022 г., Среца на експертния съвет по трансфузионна медицина</p> <p>Тема: <u>„Обзор на методите за диагностика на трансмисивни инфекции след въвеждането на молекулярната НАТ технология”</u></p>
<p>Заключителен доклад, който да обобщава данните от целия период на Програмата и който да даде обосновано становище относно тенденциите в разпространението на маркерите на трансмисивни инфекции в България за този период и да оцени ефикасността на използваните методи на тестване в трансфузионната система в България</p>	<p>1 бр.</p>	<p>Изготвен е 1 бр. заключителен анализ на цялостната дейност на изследователите във връзка с приключване на програмата.</p>