
**ACCREDITED MOLECULAR METHODS FOR DETECTION OF INFECTIONS
CAUSED BY HIV, HEPATITIS B VIRUS AND HEPATITIS C VIRUS**

Belinda Gelmanovska

University Clinic For Infectious Diseases and Febrile Conditions – Skopje, Republic of North Macedonia
belinda.gelmanovska@gmail.com

Vaso Taleski

University „Goce Delchev“-Shtip, Faculty of Medical Sciences,
Republic of North Macedonia

Abstract: Hepatitis B and C, as well as HIV infections are common pathology in present time. According current assessments 350 million are carriers of Hepatitis B virus, 170 million of Hepatitis C virus and over 60 million infected by HIV. Timely detection and prompt diagnosis of these viral infections are of great importance.

According assessments, in our country about 1 of 50 persons are infected by Hepatitis B or Hepatitis C. From the beginning of the epidemic in 1987, until 2016 total number of registered of HIV/AIDS is 311 (179 with AIDS and 131 HIV positive).

In JZU - University Clinic for Infectious Diseases and Febrile Conditions Skopje, diagnosis of these viral infections are made by accredited molecular diagnostics methods, PCR, at Department for molecular diagnostics using HCV-RNA, HBV-DNA and HIV-RNA. Aims of accreditation of particular procedures in laboratories is protection and advancing of human health, and preventing of spreading of viral infections.

With great success, Department for molecular diagnostics as part of the University Clinic For Infectious Diseases and Febrile Conditions Skopje use the System for quality management according standard MKS EN ISO 15189:2013 for medical laboratories. Accredited molecular methods in use for detection of Hepatitis C virus, Hepatitis B virus and HIV are Polymerase Chain Reaction (PCR) and Genotypisation of HCV with method of Reverse hybridization.

Keywords: accreditation, methods, hepatitis B virus, hepatitis C virus, HIV

**АКРЕДИТИРАНИ МОЛЕКУЛАРНИ МЕТОДИ ВО ИСПИТУВАЊЕ НА
ИНФЕКЦИИ СО ХИВ, ХЕПАТИТИС Б И ХЕПАТИТИС Ц ВИРУСИ**

Белинда Гелмановска

ЈЗУ.Клиника за инфективни болести и фебрилни состојби Скопје,
belinda.gelmanovska@gmail.com

Васо Талески

Факултет за медицински науки, Универзитет „Гоце Делчев“- Штип
Република Северна Македонија

Резиме: Вирусните хепатитиси Б и Ц, како и инфекцијата со ХИВ вирусот се честа патологија во денешно време. Денес се смета дека во светот има на 350 милиони лица кои се носители на Б вирусот, 170 милиони заболени од хепатитис Ц, а повеќе од 60 милиони се инфицирани со ХИВ вирусот. Затоа од големо значење е нивното навремено откривање и брзото дијагностицирање на вирусната инфекција.

Се проценува дека во нашава земја околу 1 од 50 лица се погодени од хроничен хепатитис Б или Ц, а од почетокот на пандемијата во 1987 до 2016 година вкупно се регистрирани 311 лица со ХИВ/СИДА (179 лица болни од СИДА и 131 ХИВ позитивни).

Во ЈЗУ - Универзитетска клиника за инфективни болести и фебрилни состојби Скопје дијагностицирањето на овие вирусни инфекции се извршува со акредитирани методи на молекуларна дијагностика, PCR методи, во одделот за молекуларна дијагностика и тоа испитување на HCV-RNA, HBV-DNA и HIV-RNA. Цел на акредитацијата на одредените постапки во лабораторијата е заштита и унапредување на здравјето на луѓето, како и спречување од ширење на вирусната инфекција. Отсекот за молекуларна дијагностика како дел од ЈЗУ. Универзитетска клиника за Инфективни болести и фебрилни состојби Скопје успешно го применува Системот за управување со квалитет согласно стандардот MKS EN ISO 15189:2013 за медицински лаборатории. Во Отсекот за молекуларна дијагностика се изведуваат акредитираните според стандард MKS ISO 15189:2013 молекуларно дијагностички методи на Хепатитис Ц вирус (ХЦВ), Хепатитис Б вирус (ХБВ)

и вирусот на хумана дефициенција (ХИВ) со метода на полимераза верижна реакција и генотипизација на ХЦВ со метода на реверзна хибридизација.

Клучни зборови: акредитација, методи, хепатит Б вирус, хепатит Ц вирус, ХИВ.

ВОВЕД

Вирусните хепатитиси Б и Ц, како и инфекцијата со ХИВ вирусот како во целиот свет така и во нашата држава претставуваат општествен, здравствен, социо-економски и терапевтски проблем. Денес се смета дека во светот има на 350 милиони лица кои се носители на Б вирусот, 170 милиони заболени од хепатитис Ц, а повеќе од 60 милиони се инфицирани со ХИВ вирусот. Затоа од големо значење е нивното навремено откривање и брзото дијагностицирање на вирусната инфекција. Пандемијата со ХИВ е стабилизирана на околу 2 милиони новоинфицирани годишно, и исто толку умрени пред воведувањето на антиретровирусната терапија. Во нашава земја од почетокот на епидемијата во 1987 до 2016 година вкупно се регистрирани 311 лица со ХИВ/СИДА (179 лица болни од СИДА и 131 ХИВ позитивни). Дистрибуцијата по пол покажува дека 258 лица се од машки пол, а 53 лица се од женски пол. Во 2017 година има 39 новооткриени случаи на ХИВ/СИДА.⁽⁵⁾ Вирусен хепатитис е приоритет за соработка помеѓу Министерството за здравство и СЗО. Универзалната програма за вакцинација на новороденчиња против хепатитис Б, имплементирана од 2004 година, достигна повеќе од 95% покриеност со дозата на раѓање, постигнувајќи ја целта на европскиот регион на СЗО пред крајниот рок до 2020 година. Тоа ќе обезбеди заштита на идните генерации против хепатит Б и неговите компликации, како што се цироза и рак на црниот дроб.⁽²⁾ Во ЈЗУ - Универзитетска клиника за инфективни болести и фебрилни состојби Скопје дијагностицирањето на овие вирусни инфекции се извршува со акредитирани методи на молекуларна дијагностика, PCR методи, во одделот за молекуларна дијагностика и тоа испитување на HCV-RNA, HBV-DNA и HIV-RNA. Акредитацијата е формално признавање на способноста за изведување на одредени активности. Предноста на акредитацијата првично лежи во довербата во резултатите од тестирањето, калибрацијата, сертификацијата и инспекцијата, како и во пристапот до меѓународни шеми за меѓусебно признавање на сертификатите за калибрација, извештаите за проверка и тестирање, како и во сертификатите за усогласеност или во надлежност. Меѓународното признавање на резултатите од тестирањето, сертификацијата и инспекцијата го намалува несаканото повторување на постапките и ги ублажува околностите што овозможуваат лесен проток на стоки, услуги и лица.^(3,6) Отсекот за молекуларна дијагностика при Универзитетска клиника за Инфективни болести и фебрилни состојби Скопје успешно го применува Системот за управување со квалитет согласно стандардот МКС EN ISO 15189:2013 за медицински лаборатории и се изведуваат акредитираните молекуларно дијагностички методи на Хепатитис Ц вирус (ХЦВ), Хепатитис Б вирус (ХБВ) и вирусот на хумана дефициенција (ХИВ) со метода на Полимераза верижна реакција (ПЦР) и Генотипизација на ХЦВ со метода на реверзна хибридизација.

ЦЕЛ НА ТРУДОТ

Да се прикаже начинот на акредитација и нејзината важност во извршувањето на постапките и методите за молекуларна детекција на вирусните хепатити Б, Ц и вирусот на ХИВ, да се прикажат лабораториските резултати добиени од молекуларната дијагностика на акредитираните методи за HBV-DNA, HCV-RNA и HIV-RNA, во период од шест години во одделот за молекуларна дијагностика при Универзитетската Клиника за инфективни болести и фебрилни состојби Скопје, да се прикажат варијабилностите во серолошките анализи кај пациентите со Б инфекција, Ц инфекција и ХИВ инфекција пред и после антивирусната терапија, да се прикаже позитивноста од примената на антивирусната терапија во ублажување на симптомите и продолжување на животниот век.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

Сите клинички истражувања, земањето на примероците на венска крв од пациентите, определувањето на вирусното оптеретување (*viral load*) и изолацијата на нуклеинските киселини се вршеа на Универзитетската клиника за инфективни болести и фебрилни состојби - Скопје. Земањето на примероците од венска крв од секој испитаник се вршеше со венепункција од секој пациент и тоа примерок (8,5 ml) на венска крв во вакуумирани стерилна епрувета *BD Vacutainer® PPT™ Plasma Preparation Tube K2E 15,8 mg.*^(1,4) Извршувањето на методите и нивната квантификација беше изведена со стандардна молекуларна техника со реал тајм полимераза верижна реакција: РТ-ПЦР (real time polymerase chain reaction) на апарат COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan верзија 2.0 со долна детекција за HCV-RNA од 15 IU/ml, HBV-DNA од 20 IU/ml и за HIV-RNA 20 cp/ml. Анамнестичките податоци што се однесуваат на потеклото на пациентите, полот,

националноста, возраста, местото на живеење и серолошките анализи се добиени од историите на болест на самите пациенти. Кај сите пациенти беше спроведено тестирање за лабораториски-биохемиски испитувања на примерок на серум, кое опфаќаше потребна изработка на крвна слика и хепатални проби: односно проверка на трансминазната активност, вкупен, директен и индиректен билирубин како и проверка на гама-глутамил трансферазата (GGT), определување на липиден статус преку определување на вкупен холестерол и триглицериди и др. Серолошките тестови за anti HCV, anti HIV и HBsAg беа определени преку методата ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) и тоа на апаратите BEP 2000 Advance, mini VIDAS и апаратот ARCHИТЕКТ i 1000 SRTM (1,4).

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Во отсекоот за молекуларна дијагностика при клиниката, во шестгодишен период од 2013 година до 2018 година, испитани се 834 пациенти за HCV-RNA, 426 пациенти се испитани за HBV-DNA а 1641 пациенти се испитани за HIV-RNA. Во периодот од 2013 година до 2018 година на ЈЗУ - Универзитетска клиника за Инфективни болести и фебрилни состојби Скопје во одделот за молекуларна дијагностика вкупно беа иработени 426 примероци од плазма на пациенти според акредитираната метода за испитување на ХБВ инфекција и тоа квалитативно и квантитативно анализирали.

Од вкупниот број во шестгодишниот период, во 2013 година се изработени 48 примероци и тоа (11.2%), во 2014 година се изработени 149 примероци или (34.9%), во 2015 година се изработени 62 примероци и тоа (14.5%), во 2017 година се изработени исто 62 примероци и 2018 година беа изработени 105 примероци на плазма, односно (24.6%).

Од вкупниот број на примероци за шестгодишниот период, 59 или (13.8%) беа негативни на ХБВ инфекција односно нивниот *viral load* бил испод зоната на детекција, односно недектибилни, 57 или (13.3%) имале вредност помала од 20 IU/ml, 159 примероци или (37.3%) имале вредност на *viral load* измеѓу 20-10.000 IU/ml и 151 примерок или (35.4%) имале високо ниво на детекција на вирусот, *viral load* над 10.000 IU/ml.

Во периодот од 2013 година до 2018 година на вкупно беа иработени 834 примероци од плазма на пациенти според акредитираната метода за испитување на ХЦВ инфекција и тоа квалитативно и квантитативно анализирали. Од вкупниот број во шестгодишниот период, во 2014 година се изработени 335 примероци и тоа (40.1%), во 2015 година се изработени 170 примероци и тоа (20.4%), во 2016 година се изработени 99 примероци или (11.9%), во 2017 година беа изработени 63 примероци или (7.5%) и во 2018 година беа изработени 167 примероци на плазма, или (20.0%).

Од вкупниот број на примероци за шестгодишниот период, 395 или (47.3%) беа негативни на ХЦВ инфекција односно нивниот *viral load* бил испод зоната на детекција, односно недектибилни, 32 примероци или (3.8%) имале вредност помала од 15 IU/ml, 76 примероци или (9.1%) имале вредност на *viral load* измеѓу 15-10.000 IU/ml и 331 примерок или (39.7%) имале високо ниво на детекција на вирусот, *viral load* над 10.000 IU/ml.

Во периодот од 2013 година до 2018 година вкупно беа изработени 1641 примероци од плазма на пациенти според акредитираната метода за испитување на ХИВ инфекција и тоа квалитативно и квантитативно анализирали. Од вкупниот број во шестгодишниот период, во 2014 година се изработени 240 примероци и тоа (14.6%), во 2015 година се изработени 351 примероци или (21,4%), во 2016 година беа изработени 153 примероци или (9.3%), во 2017 година беа изработени 469 примероци или (28.6%) и во 2018 година беа изработени 428 примероци на плазма, или (26.1%). Од вкупниот број на примероци за шестгодишниот период, 648 или (39.5%) беа негативни на ХИВ инфекција односно нивниот *viral load* бил испод зоната на детекција, односно недектибилни, 371 примероци или (22.6%) имале вредност помала од 20 cp/ml, 360 примероци или (21.9%) имале вредност на *viral load* измеѓу 20-10.000 cp/ml и 262 примерок или (15.9%) имале високо ниво на детекција на вирусот, *viral load* над 10.000 cp/ml. Во овој труд исто така се обработени 15 пациенти со ХБВ инфекција, 15 пациенти со Хцв инфекција и 15 пациенти со ХИВ инфекција, кај кои се одредени општите карактеристики во однос на возраста, полот, местото на живеење и кај кои успешно беше спроведена антиретровирусна терапија. Според податоците и резултатите земени од историјата на болест кај сите пациенти е забележан пад на детекцијата на HIV-RNA, HBV-DNA и HCV-RNA (*viral load*), и тоа вредности добиени под зоната на детекција или целосно негативизирање.

ЗАКЛУЧОК

Акредитацијата на разните постапки и извршени анализи во лабораториите е од големо значење, затоа што самата акредитација докажува дека лабораторијата која е акредитирана обезбедува точност, доверба, компетентност и меѓународно признавање на добиените резултати. Акредитацијата на лабораториите е

значајна за заштита и унапредување на здравјето на населението, спречување на ширење на вирусните инфекции, а со самото тоа продолжување на животниот век и заштита на животната средина. Во рамките на клиниката секојдневно се изработуваат серолошки анализи на крвни примероци од пациенти пред и после примена на антивирусна терапија. Изработката на серолошките анализи за деградационите продукти, ензимскиот статус, гликозниот статус, протеинскиот статус, имунолошкиот статус, електролитниот статус, молекуларните анализи за инфективни причинители и крвната слика, кај пациентите кои примаат антивирусна терапија, се важни показатели за спречување од несаканите ефекти од примената на таа антиретровирусна терапија. Примената од антивирусната терапија е од големо значење за самите пациенти, заради тоа што со нејзината примена се спречуваат бројните компликации кои ги предизвикува самата болест, се спречува ширењето на инфекцијата и се продолжува животниот век на самиот пациент со хроничен хепатит. Со примената на антивирусната терапија се намалува бројот на смртните случаи предизвикани од инфекцијата со овие вируси.

КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

Благоевска, М. (1997). Актуелности во трансфузиологијата, Куманово, Книга, 201-209;

Димзова, М. (2018). Прогностичко значење на квантитативниот ХБс-антиген и квантитативната ХБВ ДНК и нивната корелација кај пациенти со хронична Хепатитис Б- вирусна инфекција, докторска дисертација, Универзитет “Св.Кирил и Методиј” Скопје;

Карацовски, Ж. и Цветановска, Ж. Институт за јавно здравје Скопје. Состојба на ХИВ/СИДА во Светски, Европски рамки и Р.Македонија;

Стевановиќ, М.(2014). Клиничко, епидемиолошка и молекуларно генетска карактеризација на ХИВ инфекцијата во Република Македонија, магистерски труд, Универзитет “Св.Кирил и Методиј” Скопје; 11-12;

Талески, В.(2016). Медицинска микробиологија и паразитологија (практикум), Универзитет “Гоце Делчев” Штип Факултет за медицински науки;
<http://www.iarm.gov.mk>.