

Ukryte zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu B u krwiodawców w Tajlandii

Occult hepatitis B virus infection in Thai blood donors

Suda Louissirirochanakul, Sineenart Oota, Kalayanee Khuponsarb,
Wilai Chalermchan, Soisaang Phikulsood, Viroje Chongkolwatana,
Tasane Sakuldamrongpanish, Pimpun Kitpoka, Pimol Chielsilp, Srivilai Tanprasert,
Thaweesak Tirawatnpong, Chantapong West oraz Grupa Robocza ds. Badań NAT
w Tajlandzkim Krwiodawstwie

Zakład Mikrobiologii i Transfuzjologii Wydziału Lekarskiego, Szpital w Siriraj, Bangkok;
Narodowe Centrum Krwi, Tajlandzkie Stowarzyszenie Czerwonego Krzyża, Bangkok;
Zakład Patologii Wydziału Lekarskiego, Szpital Ramathbodi, Bangkok;
Zakład Nauk Medycznych, Ministerstwo Zdrowia Publicznego, Nonthaburi;
Zakład Mikrobiologii, Wydział Lekarski, Szpital Chulalongkorn, Bangkok, Tajlandia

Streszczenie

Wstęp: Narodowe Centrum Krwi Tajlandzkiego Stowarzyszenia Czerwonego Krzyża przeprowadziło badania oceniające przydatność dwóch komercyjnych testów (TIGRIS/PROCLEIX Ultrio firmy Chiron oraz Cobas s 201/Cobas TaqScreen MPX firmy Roche) do badań przesiewowych na obecność ludzkiego wirusa niedoboru odporności typu 1, wirusa zapalenia wątroby typu C i wirusa zapalenia wątroby typu B u krwiodawców w Tajlandii. W wyniku tego badania zidentyfikowano 175 dawców reaktywnych w badaniach NAT bez antygeny HBs. Status zakażenia HBV potwierdzono w badaniach kolejnych próbek pochodzących od tych dawców (follow-up studies).

Materiał i metody: Pierwsze próbki, w których wykryto DNA HBV (index samples) badano na obecność markerów serologicznych HBV i oznaczano w nich poziom wirerii. Kolejne próbki pobierane przez okres do 13 miesięcy od tych dawców badano obydwojoma testami NAT, jak również na obecność wszystkich serologicznych markerów HBV.

Wyniki: W kolejnych badaniach uczestniczyło 72 dawców (41%) spośród 175 dawców DNA HBV-dodatnich. U większości z nich stwierdzono ukryte zakażenie HBV (66,7%), u 26,4% stwierdzono wczesną ostrą fazę zakażenia HBV, z czego 20,8% znajdowało się w okienku serologicznym. U 3 dawców z przeciwciałami anti-HBs (4,2%) stwierdzono reaktywację

Prośby o reprints należy kierować do: Suda Louissirirochanakul, Zakład Mikrobiologii, Wydział Lekarski, Szpital w Siriraj, Uniwersytet Mahidol, Bangkok, 10700 Tajlandia; e-mail: sudalouii@yahoo.com

Pracę przyjęto do publikacji 5 kwietnia 2010 roku, wersja po recenzji wpłynęła 11 listopada 2010 roku.

Do druku przyjęto 13 listopada 2010 roku.

© Copyright for the Polish translation: Blackwell Verlag GmbH, Berlin 2011

Original article: Suda Louisirirochanakul et al. Occult hepatitis B virus infection in Thai blood donors. Transfusion 2011; 51 (7)

zakażenia HBV lub wystąpienie kolejnego zakażenia przełamującego obecne przeciwciało (break-through infection).

Wniosek: U większości dawców, których w badaniach rutynowych zidentyfikowano jako HBsAg ujemnych/NAT-dodatnich, stwierdzono ukryte zakażenie HBV, co stanowi wystarczające uzasadnienie dla wprowadzenia badań NAT w celu kwalifikacji krwiodawców w Tajlandii.

J. Transf. Med. 2011; 3: 143–154

Abstract

Background: An evaluation by the National Blood Center, the Thai Red Cross Society, of two commercial multiplex nucleic acid tests (NATs; the Chiron PROCLEIX ULTRIO test and the Roche Cobas TaqScreen MPX test) for screening Thai blood donors for hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus Type 1 identified 175 HBV NAT-reactive/hepatitis B surface antigen (HBsAg)-negative donors. The classification of the HBV infection of these donors was confirmed by follow-up testing.

Study design and methods: Index samples were tested for HBV serologic markers and HBV viral loads were determined. Donors were followed for up to 13 months and samples were tested with both NAT assays and for all HBV serological markers.

Results: Of 175 HBV NAT-yield donors, 72 (41%) were followed. Based on the follow-up results, the majority of donors who were followed had an occult HBV infection (66.7%), followed by donors with a primary, acute infection (26.4%). The majority of donors in this latter group (20.8%) were in the window period. Three donors (4.2%), who were anti-HBs positive, had a reinfection or breakthrough infection.

Conclusion: The majority of donors detected during routine screening, who were HBsAg negative and NAT reactive, had an occult HBV infection, thus validating the decision to introduce NAT for blood donations in Thailand.

J. Transf. Med. 2011; 3: 143–154

W 2007 roku Narodowe Centrum Krwi Stowarzyszenia Tajskiego Czerwonego Krzyża rozpoczęło roczne badanie oceniające przydatność rutynowych badań metodami biologii molekularnej (NAT, *nucleic acid amplification techniques*) u krwiodawców w Tajlandii [1]. Ocenie poddano dwa automatyczne, komercyjne systemy: TIGRIS/Procleix Ultrio firmy Chiron (Ultrio) oraz Cobas s 201/Cobas TaqScreen MPX (MPX) firmy Roche. W obydwu przypadkach są to testy jakościowe do jednoczesnego wykrywania ludzkiego wirusa niedoboru odporności typu 1 (HIV-1, *human immunodeficiency virus*), wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV, *hepatitis C virus*) i zapalenia wątroby typu B (HBV, *hepatitis B virus*). Test MPX ma również dodatkowo oznaczać HIV-1 grupy 0 i HIV-2. W każdym dniu pobierania dzielono próbkę na dwie części i badano pojedynczo (Tigris) lub w pulach po 6 (na aparacie Cobas s 201). Próbkę reaktywną badano na alternatywnym systemie NAT (pojedynczo/Tigris lub w pulach po 6/aparat Cobas s 201; powtórne sprawdzenie inną metodą [*cross-check method*]). Metodami biologii molekular-

nej NAT przebadano 486 676 seronegatywnych próbek krwi i w sumie zidentyfikowano 175 dawców HBV NAT-dodatnich/HBsAg-ujemnych. Wynik pełnego serologicznego badania pierwszych dodatnich donacji (*index donations*) potwierdził występowanie ukrytego zakażenia HBV u większości tych dawców [1].

Ukryte zakażenie HBV definiuje się jako obecność DNA HBV u osób bez antygenu HBs, u których pojawiły się bądź nie przeciwciała do antygenu rdzeniowego (anty-HBc) i/lub do HBsAg (anty-HBs) [2–5]. Obserwowany ostatnio wzrost zainteresowania zagadnieniem ukrytego zakażenia HBV odnosi się przede wszystkim do ryzyka przeniesienia takiego zakażenia z dawcy krwi na biorcę podanego na tego wirusa [6–8]. Dla potwierdzenia statusu zakażenia u 175 HBV-dodatnich potencjalnych dawców krwi, jak również dla uniknięcia wyników fałszywie dodatnich, przeprowadzono badania kolejnych próbek pobieranych od tych dawców, którzy wyrazili na to zgodę. Wykonano pełną charakterystykę pierwszej dodatniej próbki (*index sample*) oraz

próbek kolejnych metodą serologiczną oraz metodami biologii molekularnej. Wyniki kolejnych badań dawców HBV NAT-dodatnich mają szczególne znaczenie dla regionów południowo-wschodniej Azji, ponieważ wysoka częstość zakażeń HBV powoduje, że wielu dawców ma ukryte zakażenie HBV [9–12].

Materiały i metody

Przesiewowe badania immunologiczne

Wszystkie donacje wykorzystane w niniejszym badaniu pobrano od dawców po uprzednim uzyskaniu od nich pisemnej zgody zarówno na udział w badaniach przesiewowych, jak i w kolejnych badaniach. Próbki badano testem neutralizacji HBsAg PRISM (czułość 0,1 ng/ml), ARCHITECT anti-HCV/HIV Ag/Ab Combo (Abbott, Stuttgart, Niemcy).

Pierwsze próbki donacji HBV NAT-dodatnie/HBsAg-ujemne

W kolejnych badaniach 175 próbek HBV NAT-dodatnich/HBsAg-ujemnych w pierwszej dodatniej próbce badano obecność HBsAg, anty-HBs, całkowitego anty-HBc, HBeAg i anty HBe (ARCHITECT, Abbott) w Zakładzie Patologii Wydziału Lekarskiego Szpitala Ramathiodhi w Bangkoku (Tajlandia). Poziom wirerii w próbkach oznaczano za pomocą testu HBV Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Lekarskiego na Uniwersytecie Chulalongkorn lub w Narodowym Centrum Krwi Tajlandzkiego Stowarzyszenia Czerwonego Krzyża.

Kolejne badania dawców

Dawców HBV NAT-dodatnich/HBsAg-ujemnych zaproszono do kolejnych badań, które odbywały się w odstępach miesięcznych, a maksymalny czas trwania wynosił 13 miesięcy. Badano: pojedyncze donacje metodą NAT na aparacie Tigris oraz na aparacie Cobas 201s; HBsAg, HBeAg, anty-HBe i anty HBs; enzymy wątrobowe (aminotransferaza alaninowa [ALAT]) zgodnie z zasadami Międzynarodowego Towarzystwa Chemii Klinicznej (Roche COBAS C 501). Ponieważ w pierwszych dodatnich donacjach badano obecność całkowitej immunoglobuliny anty-HBc, próbki w kolejnych badaniach analizowano zarówno pod kątem obecności immunoglobulin całkowitych anty-HBc, jak i immunoglobuliny klasy M (IgM; ARCHITECT, Abbott).

Wyniki

Charakterystyka serologiczna i molekularna pierwszych próbek dodatnich donacji pochodzących od dawców DNA-dodatnich/HBsAg-ujemnych

W tabeli 1 przedstawiono charakterystykę serologiczną 175 dawców HBV NAT-dodatnich/HBsAg-ujemnych, zidentyfikowanych za pomocą jednego z dwóch wspomnianych wyżej systemów [1]. U większości dawców (46,9% + 17,7%, czyli 64,6% reprezentujących 113 dawców) wykryto przeciwciała anty-HBc z obecnością przeciwciał anty-HBs lub bez, podczas gdy u 14 (8%) wykryto tylko przeciwciała anty-HBs. Stężenie przeciwciał anty-HBs dla tych 14 dawców wynosiło: 19–866 IU/l dla 6 dawców, a dla pozostałych 8 powyżej 1000 IU/l.

W większości próbek (42 tj. 81,1%) wyniki były zgodne w obydwu systemach NAT i mieściły się na ogół w kategoriach „anty-HBc” oraz „ujemne dla wszystkich markerów HBV”. Wśród 33 próbek o rozbieżnych wynikach w testach NAT 27 (81,8%) było reaktywnych tylko w teście MPX, podczas gdy 6 (18,2%) tylko w teście Ultrio. W każdej z tych grup poziom wirerii był niski, a średnie poziomy dla poszczególnych markerów serologicznych przedstawiono na rycinie 1. Należy jednak stwierdzić, że poziom wirerii w grupie anty-HBc był znacząco niższy niż w grupie seronegatywnej oraz anty-HBs ($p < 0,05$, nieparametryczna analiza Kruskala-Wallisa oraz test Dunna do porównań międzygrupowych dla danych nieparametrycznych). Poziom wirerii poniżej granicy wykrywalności stwierdzono głównie w próbkach rozbieżnych w testach NAT.

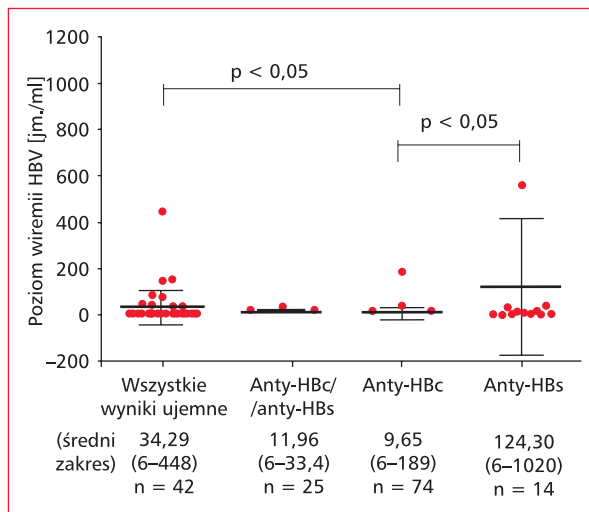
Kolejne badania

W kolejnych badaniach wzięło udział tylko 72 (41%) spośród 175 dawców DNA HBV-dodatnich/HBsAg-ujemnych. W tabeli 2 przedstawiono wyniki przesiewowych badań serologicznych dla tych dawców (zgodnie z klasyfikacją z tab. 1). W tych kolejnych badaniach uczestniczyło: 19/48 dawców (39,6%), u których nie wykryto HBV w badaniach markerów serologicznych, 10/31 dawców (32,3%), u których wykryto przeciwciała anty-HBc/anty-HBs, 38/82 dawców (46,3%), u których wykryto przeciwciała anty-HBc oraz 5/14 dawców (35,7%), u których wykryto przeciwciała anty-HBs. Badania trwały kilka miesięcy; w najdłuższym przypadku 13. W liczbie wymienionych 72 dawców badano 16/33 (48,5%), których wyniki były rozbieżne w testach NAT w pierwszej donacji dodatniej, dla 15 wyników

Tabela 1. Charakterystyka serologiczna pierwszych dodatnich donacji 175 dawców HBV DNA(+)/HBsAg(-)
Table 1. Serologic profiles of the index donations of the 175 HBV NAT-reactive/HBsAg-negative donors

Markery serologiczne HBV	Pierwsze badania przesiewowe				Powtórne badanie inną metodą				
	Testy NAT		Liczba dawców o wynikach zbieżnych w testach NAT (%)		Liczba dawców o wynikach rozbieżnych w testach NAT (%)				
	Całkowita liczba reaktywnych próbek	Ultrio (IDT)	MPX (pule po 6)	Całkowita liczba dawców	Reaktywne w Ultrio/ /potwierdzone w MPX	Reaktywne w MPX/ /potwierdzone w Ultrio	Całkowita liczba dawców	Reaktywne w Ultrio/ /niereaktywne w MPX	Reaktywne w MPX/ /niereaktywne w Ultrio
Ujemny dla wszystkich markerów	48 (27,4)	21	27	43	20 (95,2)	23 (85,2)	5	1	4
Anty-HBc i anty-HBs	31 (17,7)	12	19	21	11 (91,7)	10 (52,6)	10	1	9
Anty-HBc (tylko)	82 (46,9)	33	49	65	29 (87,9)	36 (73,5)	17	4	13
Anty-HBs (tylko)	14 (8,0)	5	9	13	5 (100)	8 (88,9)	1	0	1
Razem	175 (100)	71 (40,6)	104 (59,4)	142 (81,1)	65 (91,5)	77 (74,0)	33	6	27

Dane w postaci liczb (%); IDT (individual-donation testing) — badania pojedynczych próbek



Rycina 1. Średnie poziomy wirerii (j.m./ml) dla poszczególnych markerów wirusowych w pierwszych próbkach pochodzących od dawców DNA dodatnich/HBsAg ujemnych. n = liczba dawców w poszczególnych kategoriach z oznaczonymi poziomami wirerii. Do porównań użyto analizy Kruskala-Wallisa oraz testu Dunna do porównań międzygrupowych z zastosowaniem programu komputerowego (GraphPad Prism, version 4.0, GraphPad, Inc., San Diego, CA)

Figure 1. Mean viral loads (IU/mL) of HBV NAT-reactive but HBsAg-negative samples by serologic markers. n = number of donors in each category with detectable viral loads. Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison test were used for comparison using computer software (GraphPad Prism, Version 4.0, GraphPad, Inc., San Diego, CA)

były reaktywne w MPX i niereaktywne w teście różnicującym Ultrio, podczas gdy tylko jeden dawca był reaktywny w teście różnicującym Ultrio zaś niereaktywny w badaniu MPX (tab. 2).

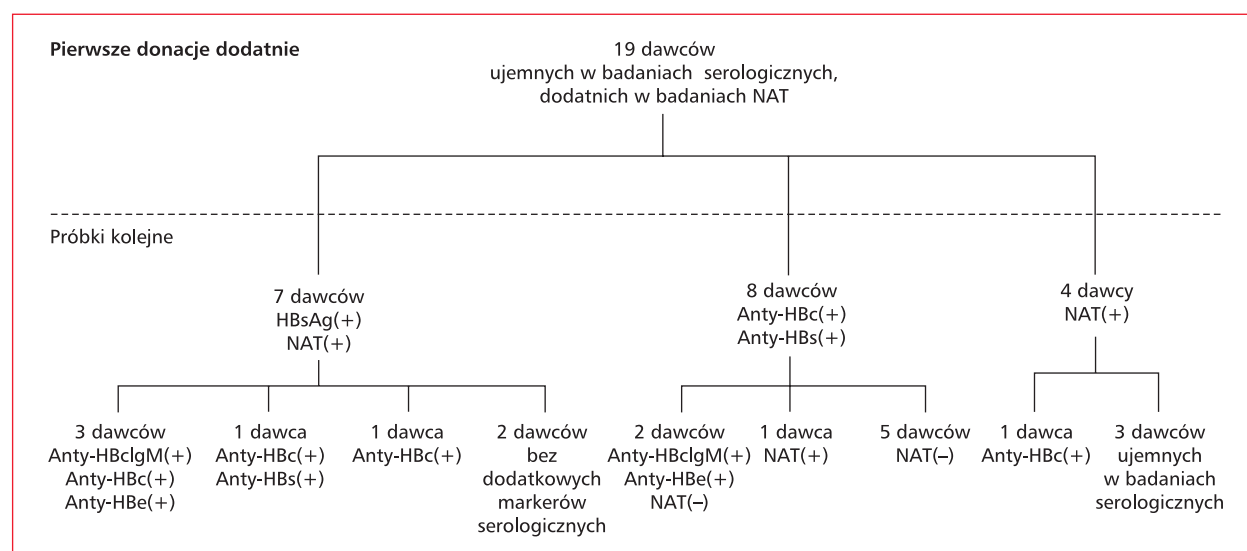
Dawcy, u których w pierwszej donacji wykryto DNA, a nie wykryto markerów serologicznych

Poziom wirerii w pierwszych dodatnich próbkach donacji pobranych od 19 dawców należących do tej kategorii wynosił od < 12 do 80 IU/ml. Charakterystykę serologiczną tych dawców oraz ich wyniki NAT przedstawiono na rycinie 2. U 7 z nich wystąpiła serokonwersja do HBsAg i wszyscy oni w kolejnych badaniach byli NAT-reaktywni. U kolejnych 8 obserwowano serokonwersję do anty-HBc i anty-HBs. Uznano, że wszystkich 15 znajdowało się w okienku serologicznym dla HBV, ponieważ wystąpiła u nich serokonwersja do HBsAg lub anty-HBc/anty-HBs i w wielu przypadkach pojawiły się dodatkowe markery serologiczne (anty-HBc IgM,

Tabela 2. Charakterystyka serologiczna 72 dawców HBV(+)/HBsAg(-), którzy wzięli udział w kolejnych badaniach
Table 2. Serologic profiles of the index donations of the 72 HBV NAT-reactive/HBsAg-negative donors who were followed

Serologiczne markery HBV	Liczba dawców (%)	Liczba dawców, o wynikach zbieżnych w testach NAT	Liczba dawców o wynikach rozbieżnych w testach NAT	Średni wiek dawców w latach (zakres)
Ujemny	19 (26,4)	15	4	28 (19–54)
Anty-HBc/anty-HBs	10 (13,9)	8	2	47 (18–59)
Anty-HBc	38 (52,8)	29	9*	41,5 (19–59)
Anty-HBs	5 (6,9)	4	1	28 (19–51)
Razem	72 (100)	56	16	36 (18–59)

*w tym jeden dawca NAT-reaktywny w Ultrio/niereaktywny w MPX spośród 4 dawców z kategorii „Anty-HBc” reaktywnych w Ultrio/niereaktywnych w MPX



Rycina 2. Wyniki badań kolejnych próbek (charakterystyka serologiczna i molekularna) 19 dawców, u których w pierwszej donacji wykryto DNA, a nie wykryto markerów serologicznych

Figure 2. Follow-up test results (serology and NAT) of the 19 donors who were NAT reactive but negative for all serologic markers on the index donation

anty-HBe) (ryc. 2). Pozostali 4 dawcy w kolejnych badaniach byli nadal DNA HBV-dodatni, przy czym u jednego z nich wystąpiła serokonwersja również do anty-HBc (ryc. 2). Tylko u jednego z trzech dawców, którzy pozostali DNA HBV-dodatni i serologicznie ujemni, wyniki pierwszej dodatniej donacji były rozbieżne w ocenianych testach (MPX-dodatnie/Ultrio-ujemne). Uznano, że u tych 4 dawców występuje ukryte zakażenie HBV.

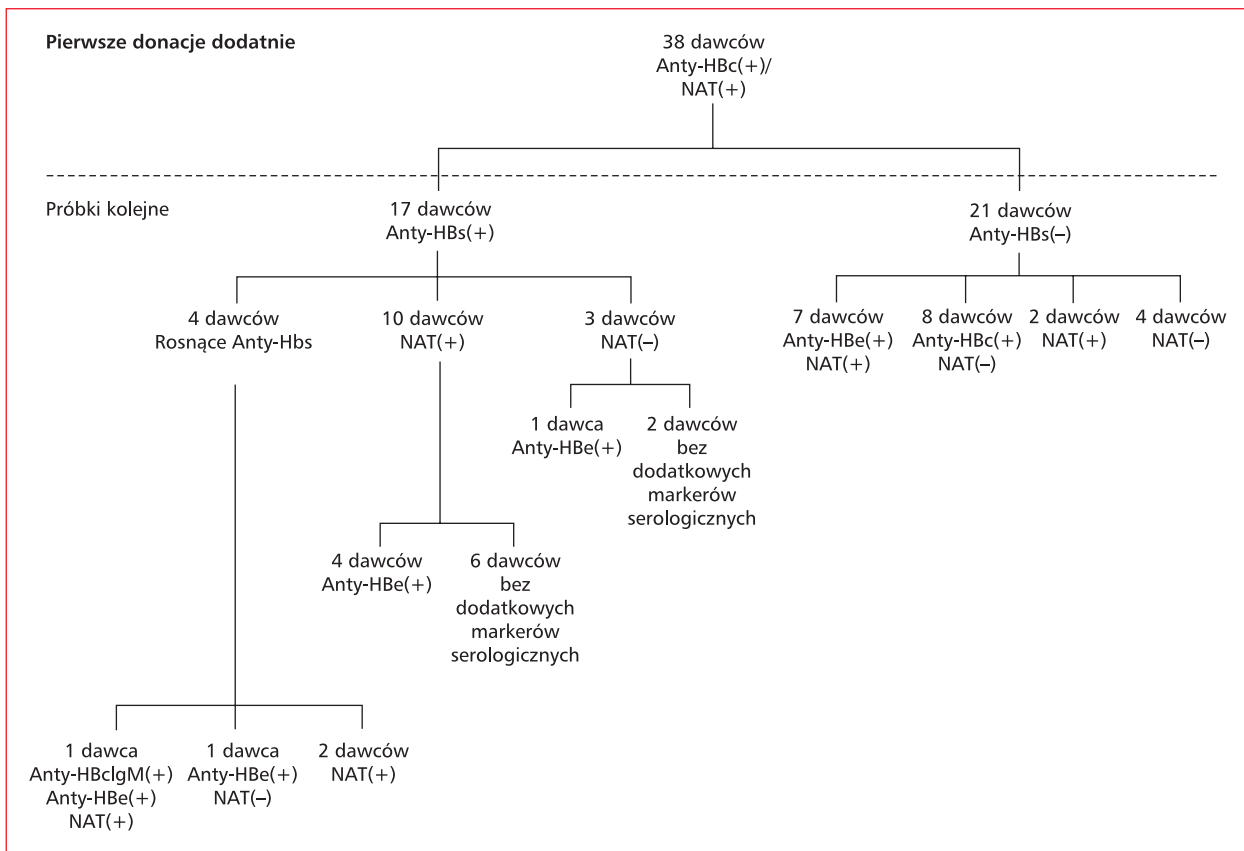
Dawcy, u których w pierwszej donacji wykryto DNA HBV i przeciwciała anty-HBc/anty-HBs

Dziesięciu dawców z tej kategorii w kolejnych próbkach nadal miało przeciwciała anty-HBc i anty-HBs (danych nie przedstawiono). Poziom wirumii

DNA HBV w pierwszych dodatnich donacjach wynosił od < 12 do 27 IU/ml. Uznano, że u osób tych występuje ukryte zakażenie HBV.

U jednego dawcy w pierwszej dodatniej próbce oraz w próbkach kolejnych wykryto przeciwciała anty-HBe, u trzech zaś zaobserwowano serokonwersję do anty-HBe. Tylko dwóch dawców było nadal DNA HBV-reaktywnych w kolejnych badaniach.

U dwóch spośród tych 10 dawców stwierdzono rozbieżne wyniki testów NAT (MPX-dodatnie/Ultrio-ujemne; tab. 2). Jednak jeden pozostał NAT-dodatni w kolejnych badaniach, u drugiego zaś wystąpiła serokonwersja do anty-HBe. Uznano, że w obydwu przypadkach wystąpiło ukryte zakażenie HBV.



Rycina 3. Wyniki kolejnych badań (serologicznych i molekularnych) wykonane dla 38 dawców, u których w pierwszej dodatniej donacji wykryto tylko przeciwciała anti-HBc

Figure 3. Follow-up test results (serology and NAT) of the 38 donors who were NAT reactive and positive for anti-HBc only on the index donation

Dawcy, u których w badaniach serologicznych pierwszej dodatniej donacji wykryto przeciwciała anti-HBc

W kolejnych badaniach uczestniczyło 38 dawców z tej kategorii, a poziom wirerii DNA HBV w pierwszej dodatniej donacji (*index donation*) wynosił od < 12 do 40 IU/ml. U 17 z nich wystąpiła serokonwersja do anti-HBs (ryc. 3); u 4 stwierdzono rosnące stężenie przeciwciał anti-HBs (do > 1000 IU/ml); prawdopodobnie spowodowane pierwotną odpowiedzią anti-HBs, co można zaklasyfikować jako ostrą, późną fazę zakażenia HBV. Stwierdzona początkowo obecność przeciwciał anti-HBc u jednego z tych 4 dawców prawdopodobnie wynikała z obecności przeciwciał anti-HBc klasy IgM, albowiem w kolejnej próbce tego dawcy (*follow-up sample*) wykryto obecność immunoglobuliny całkowitej oraz IgM. U 2 z nich wystąpiła również serokonwersja do anti-HBe (ryc. 3). Spośród pozostałych 13 dawców, u których wykryto przeciwciała anti-HBs, w kolejnych badaniach 10 okazało

się DNA/NAT-dodatnich (ryc. 3). Tych 13 dawców uznano za przypadki ukrytego zakażenia HBV.

U żadnego z pozostałych 21 dawców z przeciwciałami anti-HBc nie stwierdzono serokonwersji do anti-HBs i nie u wszystkich w kolejnych badaniach obserwowano serokonwersję do anti-HBe i reaktywność w teście NAT (ryc. 3). U jednego z 4 dawców, u których nie wystąpiła serokonwersja do dodatkowych markerów serologicznych, a którzy w kolejnych badaniach okazali się NAT-niereaktywni, stwierdzono niezgodność w NAT dla pierwszej donacji dodatniej (MPX dodatnie/Ultrio ujemne). Zakwalifikowano ten przypadek jako niepotwierdzony. Pozostałych 20 dawców można było uznać za przypadki ukrytego zakażenia HBV.

Dawcy, u których w pierwszej DNA HBV-dodatniej donacji wykryto przeciwciała anti-HBs

Pięciu dawców z tej kategorii w kolejnych badaniach pozostało anti-HBs przez cały czas obserwacji

(dane nieprezentowane). Poziom wirerii w pierwszych dodatnich donacjach tych dawców wynosił 15,6–1020 IU/ml. W badaniach kolejnych próbek (wykonanych po miesiącu), u jednego dawcy wykryto przeciwciała anti-HBc klasy IgM. Miał on najwyższy w całym badaniu poziom wirerii DNA HBV (1020 IU/ml). U dwóch dawców wystąpiła serokonwersja do anti-HBc, a poziom wirerii wzrósł odpowiednio od 225 i 26,1 IU/ml do 656 i > 1000 IU/ml w 3 miesiące i 1 miesiąc w stosunku do pierwszej donacji dodatniej (dane nieprezentowane). Te dane oraz wiek dawców (w przypadku trzech: 20–30 lat) świadczą o ponownym zakażeniu (reinfekcji) zimmunizowanego dawcy (o zakażeniu przełamującym odporność [*breakthrough infection*]). U czwartego dawcy wystąpiła serokonwersja do anti-HBc; przypadek zaklasyfikowano jako ukryte zakażenie HBV. U piątego dawcy nie obserwowano serokonwersji do żadnego z dodatkowych markerów, a wyniki NAT w kolejnych badaniach były ujemne. Ze względu na rozbieżny wynik w testach NAT dla pierwszej donacji dodatniej (MPX dodatnie/Ultrio ujemne), jak również na fakt, że pierwotna ocena nie znalazła potwierdzenia w badaniach kolejnych, wynik badania przesiewowego uznano za niepotwierdzony w NAT.

Korelacja pomiędzy wynikami badań serologicznych HBV a wiekiem dawców

W tabeli 2 przedstawiono średnią wieku oraz przedziały wiekowe dla wszystkich kategorii dawców. Średnia wieku dawców z wykrytymi przeciwciałami anti-HBc lub anti-HBc/HBs była wyższa (odpowiednio 41,5 i 47 lat) niż dawców, u których nie wykryto takich przeciwciał, znaleziono zaś tylko przeciwciała anti-HBs (śr. wieku 28 lat); różnice statystycznie istotne (nieparametryczna analiza Kruskala-Wallisa, $p < 0,05$). Spośród 72 dawców uczestniczących w dalszych badaniach, 73,6% to mężczyźni (dane nieprezentowane). Dla porównania, w ogólnej liczbie 175 dawców DNA HBV-dodatnich w badaniu przesiewowym 60% (105) stanowili mężczyźni, a 40% (70) kobiety. Stosunek liczby kobiet do mężczyzn w badaniach kolejnych i w badaniu przesiewowym nie różnił się w sposób istotny ($p = 0,0602$).

Ostateczne podsumowanie klasyfikacji zakażenia HBV u dawców

W tabeli 3 przedstawiono ostateczną klasyfikację zakażenia HBV u dawców na podstawie wyników uzyskanych w badaniach kolejnych próbek. W kategorii dawców z ostrym zakażeniem HBV, 15 znajdowało się w okienku serologicznym, 4 zaś w późnej fazie ostrego zakażenia. U większości daw-

ców (48/72, 66,7%) stwierdzono ukryte zakażenie HBV. Odnotowano trzy przypadki przełamującego odporność zakażenia (reinfekcji). W kolejnych badaniach, u 16 dawców stwierdzono niezgodność wyników DNA HBV w pierwszej dodatniej donacji, jednak tylko u dwóch z nich (obaj MPX NAT-dodatni i Ultrio NAT-ujemni) w kolejnych próbkach nie stwierdzono zmian w badaniach serologicznych i nie potwierdzono reaktywności w NAT; przypadki te uznano za niepotwierdzone.

Zaobserwowano także pewną zależność pomiędzy wiekiem pacjenta a kategorią zakażenia HBV. Dawcy, u których w badaniach serologicznych wykryto przeciwciała anti-HBc lub anti-HBc i anti-HBs byli na ogół starsi (śr. wieku 41,5–47 lat) i w ich przypadku prawdopodobieństwo stwierdzenia ukrytego zakażenia HBV było większe (tab. 2, 3). Z kolei średnia wieku dawców, u których w badaniach serologicznych nie wykryto żadnych markerów serologicznych lub wykryto tylko przeciwciała anti-HBs, wynosiła 28 lat. W tych przedziałach wiekowych większe było prawdopodobieństwo zakażenia w okienku serologicznym lub zakażenia przełamującego odporność (*breakthrough infection*) (tab. 3).

Ekstrapolacja wyników klasyfikacji zakażenia HBV na wszystkich dawców DNA HBV-dodatnich

Kolejnymi badaniami objęto tylko 72 dawców, jednak wyniki klasyfikacji zakażenia HBV przeniesiono metodą ekstrapolacji na wszystkich 175 dawców HBV NAT-dodatnich (tab. 4). U większości z nich (65,7%) stwierdzono ukryte zakażenie HBV, 21,7% dawców znajdowało się w okienku serologicznym, u 5% wystąpiło ostre pierwotne zapalenie wątroby w późnej fazie zakażenia, u 4,6% reaktywacja zakażenia lub zakażenie przełamujące odporność (*breakthrough infection*) zaś 2,9% dawców przyznano status „niepotwierdzony”.

Dyskusja

Z niniejszego badania jasno wynika, że wprowadzenie dodatkowych badań NAT dla krwiodawców w Tajlandii przyczyniłoby się do dyskwalifikacji osób zakażonych HBV. Wynik badania przeprowadzonego niedawno na Tajwanie [13] wykazał, jak istotne znaczenie mają dalsze badania/monitorowanie dawców DNA HBV-dodatnich (NAT). Okazało się również, że próbki o tak niskim poziomie wirerii DNA HBV należy badać w dłuższym okresie w celu potwierdzenia reaktywności.

Potwierdzenie wyników NAT wyłącznie na podstawie wyników testów serologicznych w pierwszej

Tabela 3. Klasyfikacja zakażenia HBV u dawców na podstawie wyników kolejnych badań**Table 3.** Classification of HBV infection in donors based on follow-up study

Kategoria zakażenia HBV	Liczba dawców	Wyniki testów serologicznych pierwszej dodatniej donacji	Wyniki testów serologicznych i molekularnych w kolejnych donacjach*
Pierwotne, ostre zakażenie Okienko serologiczne	15	Ujemny	HBsAg Anty-HBc IgM Anty-HBc Anty-HBs
Faza późna	4	Anty-HBc	Anty-HBc Rosnące anty-HBs DNA HBV Anty-HBe
Ukryte zakażenie HBV	4	Ujemny	DNA HBV Anty-HBc
	10	Anty HBC/anty-HBs	Anty-HBc Anty-HBs DNA HBV Anty-HBe
	33	Anty-HBc	Anty-HBs Anty-HBc DNA HBV Anty-HBe
Reinfekcja lub zakażenie przełamujące odporność (<i>breakthrough infection</i>)	3	Anty-HBs	Anty-HBs Anty-HBc Rosnące anty-HBs Anty-HBc Anty-HBC IgM DNA HBV
Wynik niepotwierdzony	1	Anty-HBc	
	1	Anty-HBs	
Razem	72		

*Większość wyszczególnionych markerów zakażenia HBV, chociaż niekoniecznie wszystkie, pojawiała się w badaniach kolejnych donacji

Tabela 4. Wyniki klasyfikacji zakażenia HBV dla 72 dawców w kolejnych badaniach ekstrapolowane na 175 dawców DNA HBV-dodatnich/HBsAg-ujemnych**Table 4.** Number of donors in each HBV infection category extrapolated to include the 175 HBV NAT-yield donors (based on the results of 72 donors who were followed)

Kategoria zakażenia HBV	Liczba dawców DNA HBV-dodatnich w poszczególnych kategoriach zakażenia HBV (%)	
	Liczba (%) dawców na podstawie wyników uzyskanych dla 72 dawców	Liczba (%) po ekstrapolacji na 175 dawców DNA HBV(+)/HBsAg(-)
Pierwotne, ostre zakażenie		
Okienko serologiczne	15 (20,8)	38 (21,7)
Faza późna	4 (5,5)	9 (5,0)
Ukryte zakażenie HBV	48 (66,7)	115 (65,7)
Reinfekcja lub zakażenie przełamujące odporność (<i>breakthrough infection</i>)	3 (4,2)	8 (4,6)
Wynik niepotwierdzony	2 (2,7)	5 (2,9)
Razem	72	175

donacji dodatkowo okazało się niemożliwe ze względu na częstość występowania markerów serologicznych HBV w Tajlandii [9, 10, 14]. Podobnie jak w dotychczas opublikowanych badaniach [13, 15, 16], w tym także nie udało się zapewnić uczestnictwa w kolejnych badaniach wszystkich dawców DNA HBV-dodatnich, a udział w nich wzięło niecałe 50%.

Większość próbek HBV NAT-reaktywnych w kolejnych badaniach (56/72, tj. 77,8%) było również dodatnich zarówno w teście Ultrio, jak i MPX. W testach tych stosuje się różne technologie amplifikacji (amplifikację przez odwrotną transkrypcję [TMA, *transcription-mediated amplification*] dla Ultrio oraz reakcję łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym [*real-time polymerase chain reaction*] dla MPX) i różne platformy/aparaty (odpowiednio Tigris i s 201) dlatego uznano, że reaktywność tych próbek w NAT uzyskała potwierdzenie. Niezależnie od zbieżności bądź rozbieżności w testach NAT dawców, których próbki w badaniach kolejnych były powtarzalnie reaktywne, a także tych, u których wystąpiła serokonwersja do jednego lub kilku markerów serologicznych, a którzy nie byli NAT-reaktywni w badaniach kolejnych, zaliczono do kategorii zakażonych wirusem HBV. Do kategorii „HBV niepotwierdzone” zaliczano dawców o wynikach rozbieżnych w testach NAT dla pierwszej dodatniej donacji, którzy w badaniach kolejnych byli niereaktywni w NAT i u których, w badaniach tych nie wystąpiła serokonwersja do żadnego z dodatkowych markerów serologicznych.

Jak można się było spodziewać, u większości dawców (66,7%) w kolejnych badaniach stwierdzono ukryte zakażenie HBV (tab. 3). W innych publikacjach [16, 17, 28] do przypadków ukrytego zakażenia HBV na ogół zalicza się również dawców z przeciwciałami anti-HBc lub anti-HBc/anti-HBs. Wcześniej opisano także przypadki dawców z ukrytym zakażeniem HBV [2, 3, 18], u których wykryto tylko DNA HBV; w badaniu autorów niniejszej pracy takich dawców było 3 (ryc. 2; wszyscy 3 dawcy byli NAT-reaktywni, a w badaniach kolejnych nie wykryto u nich markerów serologicznych).

Nieoczekiwanie u 26,4% dawców, którzy byli poddani kolejnym badaniom, stwierdzono pierwotne ostre zakażenie HBV, przy czym większość z nich (20,8%) znajdowała się w okienku serologicznym. Trzej dawcy uczestniczący w badaniu prawdopodobnie byli zimmunizowani, a mimo to wystąpiło u nich zakażenie (*breakthrough infection*); świadczy o tym fakt, że przeciwciała anti-HBs były jedynym markerem zakażenia wykrytym w badaniach serologicznych pierwszej dodatniej donacji. Nie udało się tego potwierdzić, ale wnioskując

z młodego wieku (20–30 lat) były to prawdopodobnie osoby, które w dzieciństwie zaszczepiono. Podobne przypadki przełamania odporności opisywano również w innych badaniach [15, 19], a przed takim zakażeniem szczepienia nie dają ochrony. *Breakthrough infections* zalicza się do zakażeń o charakterze subklinicznym, a w niektórych kolejnych próbkach antygeny HBs nie wykryto z powodu gwałtownego wzrostu stężenia przeciwciał anti-HBs [5, 15]. Odnotowano przypadek dwóch dawców, u których w próbkach kolejnych konsekwentnie nie wykrywano żadnych markerów serologicznych, a wyniki DNA HBV były również ujemne. Dawcy ci mieli także wyniki rozbieżne w testach NAT (MPX-dodatnie, Ultrio-ujemne). Z kilku powodów przypadki te zakwalifikowano jako niepotwierdzone nie zaś fałszywie dodatnie. Algorytm postępowania w przypadku badania pierwszych dodatnich donacji testem MPX obejmował pobieranie i badanie w duplikacie próbek osocza każdej NAT-reaktywnej donacji [1]. Można było zatem wykluczyć zanieczyszczenie krzyżowe. W celu zidentyfikowania wirusa w donacji próbki powtórnie reaktywne badano za pomocą COBAS AmpliScreen HBV, HCV i HIV-1 firmy Roche [1]. Chociaż testy MPX i AmpliScreen HBV amplifikują ten sam region genomu HBV, to primery różnią się (Dr K. Young, Roche Molecular System, przekaz ustny, marzec 2010 r.) podobnie jak formaty testów; MPX jest oparty na reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (*real-time PCR*) z wykorzystaniem sond typu Taqman, podczas gdy w teście AmpliScreen ocenia się końcowy produkt reakcji PCR.

Wyniki dla 72 dawców uzyskane w badaniach kolejnych próbek (tab. 4) ekstrapolowano na 175 dawców DNA HBV-dodatnich, w celu ich kategoryzacji według statusu zakażenia HBV. Należy jednak pamiętać, że dawców do badań kolejnych nie wybierano losowo, a nadreprezentacja jednej z grup mogła przyczynić się do zakłócenia wyniku. Niemniej jednak procedura ekstrapolacji pozwoliła oszacować częstość występowania poszczególnych kategorii zakażenia HBV w populacji dawców w Tajlandii.

Zgodnie z oczekiwaniem, większość przypadków HBV-dodatnich stanowili dawcy z ukrytym zakażeniem HBV. Częstość ukrytego zakażenia HBV wyliczona na podstawie liczby dawców w poszczególnych kategoriach zakażenia po ekstrapolacji wyników z badań kolejnych (tab. 4) okazała się bardzo wysoka i wynosiła 1 na 4232 (486 676/115). Drugie co do częstości było pierwotne ostre zakażenie — 1 na 10 335 dawców (486 676/19). Częstość występowania zakażenia HBV pozostaje w ścisłym związku z endemicznością HBV w danym regionie

[5]. Częstość wykrywania ukrytego zakażenia HBV kształtuje się od 1 na 60 000 dla Stanów Zjednoczonych [15] do około 1 na 770 000 w Niemczech [20]. Częstość ta wzrasta do 1 na 107 000 w regionach umiarkowanie endemicznych, takich jak Japonia [21], a nawet do 1 na 800 w Tajlandii [22] i przewyższa ogólną częstość 1 na 2781 (486 676/175) uzyskaną w niniejszym badaniu. Świadczy to o różnicach w częstości występowania HBV w zależności od populacji dawców [10].

Ukryte zakażenie HBV jest coraz powszechniej analizowanym problemem, szczególnie w regionach o dużej częstości jego występowania, na przykład na terenach południowo-wschodniej Azji. Ukryte zakażenie HBV często bywa następstwem ostrego zapalenia wątroby i może utrzymywać się długo po eliminacji antygeny HBs [23, 24]. U osób z ukrytym zakażeniem HBV wykrywa się DNA HBV w surowicy, w komórkach limfatycznych i/lub w tkance wątroby przy braku antygeny HBs, przy obecności lub braku przeciwciał anti-HBc i anti-HBs [2, 3, 5]. U dawców z ukrytym zakażeniem HBV uczestniczących w niniejszym badaniu stwierdzono obecność całego panelu markerów serologicznych oraz markerów NAT; począwszy od przypadków z przeciwciałami anti-HBc, anti-HBs, anti-HBe oraz NAT do przypadków z jednym tylko markerem serologicznym lub markerem NAT (ryc. 2 i 3). Ponadto, w badaniach kolejnych próbek zaobserwowano zmiany poziomów markerów serologicznych i DNA (dane nieprezentowane).

W rzadkich przypadkach brak antygeny powierzchniowego wirusa (HBsAg) może być spowodowany występowaniem mutantów ucieczki HBsAg (*escape mutants*) nierozpoznawanych (lub słabo rozpoznawanych) przy zastosowaniu obecnie dostępnych testów serologicznych [2, 5]. W niektórych sprawozdaniach do kategorii ukrytego zakażenia HBV zalicza się również okres okienka serologicznego poprzedzający fazę ostrego zakażenia, ponieważ wykrywa się DNA HBV w surowicy i tkance wątroby przy braku HBsAg [5, 24, 25]. Jednak, w odróżnieniu od przypadków ukrytego zakażenia HBV spowodowanego zanikającym zakażeniem (*resolving infections*), przypadki ukrytego zakażenia HBV w okienku serologicznym są bardziej zakaźne i zdolne do przeniesienia wirusa zapalenia wątroby typu B [24, 25]. Ostatnio doniesiono o niezwyklej przypadku ustąpienia ostrego zakażenia HBV [26]; u dawcy z Hiszpanii rozwinęła się ostra postać HBV z wysokim poziomem DNA HBV przy braku markerów serologicznych (klasyczny przypadek okienka serologicznego). Nie wykryto u niego nigdy antygeny powierzchniowego wirusa (HBsAg), ale za-

obserwowano serokonwersję do antyHBs i anty-HBc, przy czym DNA HBV zanikło po upływie dwóch miesięcy. Uznano więc, że antygeny HBs nie wykryto z powodu niskiego poziomu HBsAg, a w konsekwencji również niskiego stosunku cząstek HBV i subwirusowych cząsteczek HBsAg. Podobne zjawisko opisali już wcześniej Chudy i wsp. [27]. Z przeprowadzonych przez nich badań wynika, że przy ukrytym zakażeniu HBV antygen powierzchniowy HBs (HBsAg) występuje w surowicy, ale w stężeniu niewykrywalnym za pomocą obecnie dostępnych testów. Z dwóch prac opublikowanych ostatnio w Japonii wynika, że zwiększenie czułości testów wykrywających HBsAg [28] lub zwiększenie stężenia („zagęszczenia”) wirusa przed badaniem w kierunku HBsAg [29] może spowodować wykrycie HBsAg w sytuacjach dotychczas uznawanych za przypadki ukrytego zakażenia HBV.

Właściwości zakaźne krwi pobranej od dawców z ukrytym zakażeniem HBV nie są do końca wyjaśnione, ale z pewnością zależą od dawki zakaźnej oraz sprawności układu immunologicznego biorcy [2]. W większości przypadków ukrytego zakażenia HBV poziom wirerii nie przekracza 300 IU/ml [2]; potwierdził to również wynik badania autorów niniejszego artykułu. Z pracy opublikowanej przez Japoński Czerwony Krzyż [6] wynika, że donacje pochodzące od dawców z ukrytym zakażeniem HBV o niskim mianie przeciwciał anti-HBc przenosiły wirusa zapalenia wątroby w 1 na 33 przetoczonych składników, ale do zakażenia nie dochodziło, jeśli jednocześnie występowały przeciwciała anti-HBs (poziomu przeciwciał nie podano). Dla porównania, 50% donacji w okienku serologicznym zarażało HBV. Ostatnie badania ze Słowenii [7] donoszą o zakażeniu HBV dwóch biorców, chociaż w donacji dawcy stwierdzono obecność zarówno przeciwciał anti-HBs (12 IU/ml), jak i anti-HBc. Poziom DNA HBV w tej donacji wynosił 180 IU/ml. Jest jasne, że krew pochodząca od dawcy z ukrytym zakażeniem HBV, nawet przy niskich stężeniach przeciwciał anti-HBs, może zarażać wirusem zapalenia wątroby typu B.

W badaniu przesiewowym 175 DNA HBV-dodatnich dawców wyniki dla 33 były rozbieżne w testach NAT; dla 6 były dodatnie tylko w teście Ultrio (w pojedynczych donacjach), a dla 27 — tylko w teście MPX (w pulach po 6 donacji). Szesnastu spośród dawców o wynikach rozbieżnych w testach NAT uczestniczyło w kolejnych badaniach; 15 było reaktywnych tylko w teście MPX; jeden zaś tylko w teście Ultrio. Jako „niepotwierdzone” zaklasyfikowano tylko 2 przypadki dawców rozbieżnych w testach NAT, którzy wzięli udział w kolejnych badaniach. Na podstawie wyników badań serologicznych/

/pierwszej dodatniej próbki zaliczono ich do kategorii „z przeciwciałami anti-HBc” i „z przeciwciałami anti-HBs”, a obydwie próbki były dodatnie tylko w teście MPX. Stosując metodę ekstrapolacji wyników uzyskanych dla 27 dawców początkowo dodatnich tylko w teście MPX, 4 prawdopodobnie zaliczono by do kategorii wynik „niepotwierdzony”. W przypadku 6 dawców dodatnich tylko w teście Ultrio metoda ekstrapolacji okazałaby się niewiarygodna ponieważ w badaniach kolejnych uczestniczył tylko jeden dawca z tej kategorii; był to potwierdzony przypadek zakażenia HBV. Niemniej, test MPX okazuje się bardziej czuły do wykrywania DNA HBV, nawet w pulach po 6 donacji niż test Ultrio stosowany do badań w pojedynczych donacjach; za pomocą tego pierwszego wykryto co najmniej 23 dodatkowe przypadki DNA HBV, a za pomocą testu Ultrio, tylko 6.

W podsumowaniu należy podkreślić, że badania krwiodawców w Tajlandii metodami biologii molekularnej, szczególnie w kierunku zakażenia HBV, mają niezwykle istotne znaczenie dla zdrowia publicznego i są w efekcie bardziej opłacalne niż w krajach o znacznie niższej częstości występowania HBV, takich jak Stany Zjednoczone Ameryki Północnej czy Holandia [30, 31]. Liczba dawców zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu B, jaką udało się autorom wykryć w efekcie prezentowanego badania potwierdza zasadność stosowania takich badań w populacji krwiodawców. Pojawiają się bowiem inne problemy związane z wprowadzeniem przeglądowych badań w kierunku HBV NAT; jednym z nich jest weryfikacja stanu zakażenia dawcy. W tym celu niezbędne są dalsze badania.

Podziękowania

Autorzy składają podziękowanie Petai Unpol z Narodowego Instytutu Zdrowia, Ministerstwa Zdrowia Publicznego oraz Sumontida Sayachak z Narodowego Centrum Krwi Tajlandzkiego Stowarzyszenia Czerwonego Krzyża za pomoc przy badaniu próbek.

Konflikt interesów

Nie zgłoszono

Tłumaczenie: mgr Krystyna Dudziak

Piśmiennictwo

1. Phikulsd S., Oota S., Tirawatnpong T. i wsp.; The Working Group for NAT Study in Thai Blood Donations. One-year experience of nucleic acid technology testing for human immunodeficiency virus Type 1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus in Thai blood donations. *Transfusion* 2009; 49: 1126–1135.
2. Allain J.-P. Occult hepatitis B infection: implications in transfusion. *Vox Sang.* 2004; 86: 83–91.
3. Raimondo G., Pollicino T., Cacciola I., Squadrito G. Occult hepatitis B infection. *J. Hepatol.* 2007; 46: 160–170.
4. Van Hemert F.J., Zaaijer H.L., Berkhout B., Lukashov V.V. Occult hepatitis B infection: an evolutionary scenario. *Virol. J.* 2008; 5: 146–158.
5. Hollinger F.B. Hepatitis B virus infection and transfusion medicine: science and the occult. *Transfusion* 2008; 48: 1001–1026.
6. Satake M., Taira R., Yugi H., Hino S., Kanemitsu K., Ikeda H., Tadokoro K. Infectivity of blood components with low hepatitis B virus DNA levels identified in a look back program. *Transfusion* 2007; 47: 1197–1205.
7. Levicnik-Stežinar S., Rahne-Potokar U., Candotti D., Lelie N., Allain J.-P. Anti-HBs positive occult hepatitis B virus carrier blood infectious in two transfusion recipients. *J. Hepatol.* 2008; 48: 1022–1025.
8. Dettori S., Candido A., Kondili L.A. i wsp. Identification of low HBV-DNA levels by nucleic acid amplification test (NAT) in blood donors. *J. Infec.* 2009; 59: 128–133.
9. Luksamijarulkul P., Thammata N., Tiloklurs M.. Seroprevalence of hepatitis B, hepatitis C and human immunodeficiency virus among blood donors, Phitsanulok Regional Blood Center, Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 2002; 33: 272–279.
10. Ishida T., Takao S., Settheetham-Ishida W., Tiwawech D. Prevalence of hepatitis B and C virus infection in rural ethnic populations of Northern Thailand. *J. Clin. Virol.* 2002; 24: 31–35.
11. Liu C.J., Chen D.S., Chen P.J. Epidemiology of HBV infection in Asian blood donors: emphasis on occult HBV infection and the role of NAT. *J. Clin. Virol.* 2006; 36: S33–44.
12. Comanor L., Holland P. Hepatitis B virus blood screening; unfinished agendas. *Vox Sang.* 2006; 91: 1–12.
13. Li L., Chen P.J., Chen M.H., Chak K.F., Lin K.S., Lin Tsai S.J. A pilot study for screening blood donors in Taiwan by nucleic acid amplification technology: detecting occult hepatitis B virus infection and closing the serologic window for hepatitis C virus. *Transfusion* 2008; 48: 1198–1206.
14. Wiwanitkit V. Anti HCV seroprevalence among the voluntary blood donors in Thailand. *Hematol. J.* 2005; 10: 431–433.
15. Linauts S., Saldanha J., Strong D.M. PRISM hepatitis B surface antigen detection of hepatitis B virus minipool nucleic acid yield samples. *Transfusion* 2008; 48: 1376–1382.
16. Katsoulidou A., Paraskevis D., Magiorkinis E. i wsp. Molecular characterization of occult hepatitis B cases in Greek blood donors. *J. Med. Virol.* 2009; 81: 815–825.
17. Manzini P., Giroto M., Borsotti R. i wsp. Italian blood donors with anti-HBc and occult hepatitis B infection. *Hematol. J.* 2007; 92: 1664–1670.
18. Torbenson M., Thomas D.L. Occult hepatitis B. *Lancet* 2002; 2: 479–486.
19. Lui C.J., Lo S.C., Kao J.H. i wsp. Transmission of occult hepatitis B virus by transfusion to adult and pediatric recipients in Taiwan. *J. Hepatol.* 2006; 44: 39–46.
20. Hourfar M.K., Jork C., Schottstedt V. i wsp. Experience of German Red Cross blood donor services with nucleic acid testing: results of screening more than 30 million blood donations for human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus and hepatitis B virus. *Transfusion* 2008; 48: 1558–1566.
21. Reesink H.W., Engelfriet C.P., Henn G., Mayr W.R., Delage G., Bernier F., Krusius T., Assal A., Gallian P., Corbi C., Morel P.,

- David B., De Micco P., Murokawa H., Yugi H., Hino S., Tadokoro K., Flesland O., Brojer E., Letowska M., Olim G., Nascimento F., Gonsalves H., Castro L. i wsp. Occult hepatitis B infection in blood donors. *Vox Sang.* 2008; 94: 153–166.
22. Nantachit N., Thaikruea L., Thongsawat S., Leetrakool N., Fongsatikul L., Sompan P., Fong Y.L., Nichols D., Ziermann R., Ness P., Nelson K.E. Evaluation of a multiplex human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus and hepatitis B virus nucleic acid testing assay to detect viremic blood donors in northern Thailand. *Transfusion* 2007;47:1803-8.
23. Mulrooney-Cousins P.M., Michalak T.I. Persistent occult hepatitis B virus infection: experimental findings and clinical implications. *World J. Gastroenterol.* 2007; 13: 5682–5686.
24. Yoshikawa A., Gotanda Y., Itabashi M., Minegishi K., Nishioka K.; The Japanese Red Cross NAT Screening Research Group. Hepatitis B NAT virus-positive donors in the early and late stages of HBV infection: analyses of the WP and kinetics of DNA HBV. *Vox Sang.* 2005; 88: 77–86.
25. Yoshikawa A., Gotanda Y., Minegishi K. i wsp. The Japanese Red Cross NAT Screening Research Group. Length of hepatitis B viremia and antigenemia in blood donors: preliminary evidence of occult (hepatitis B surface antigen-negative) infection in the acute phase. *Transfusion* 2007; 47: 1162–1171.
26. Bremer C.M., Saniewski M., Wend U.C. i wsp. Transient occult hepatitis B virus infection in a blood donor with high viremia. *Transfusion* 2009; 49: 1621–1629.
27. Chudy M., Schmidt M., Czudai V. i wsp. Hepatitis B virus genotype G mono-infection and its transmission by blood components. *Hepatology* 2006; 44: 99–107.
28. Togashi H., Hashimoto C., Yokozawa J. i wsp. What can be revealed by extending the sensitivity of HBsAg detection to below the present limit? *J. Hepatol.* 2008; 49: 17–24.
29. Satoh K., Iwata-Takakura A., Yoshikawa A. i wsp. A new method of concentrating hepatitis B virus (HBV) DNA and HBV surface antigen: an application of the method to the detection of occult HBV infection. *Vox Sang.* 2008; 95: 174–180.
30. Marshall D.A., Kleinman S.H., Wong J.B. i wsp. Cost-effectiveness of nucleic acid test screening of volunteer blood donations for hepatitis B, hepatitis C and human immunodeficiency virus in the United States. *Vox Sang.* 2004; 86: 28–40.
31. Borkent-Raven B.A., Janssen M.P., van der Poel C.L., de Wit G.A., Bonsel G.J., van Hout B.A. Cost-effectiveness of additional hepatitis B virus nucleic acid testing of individual donations or minipools of six donations in the Netherlands. *Transfusion* 2009; 49: 311–319.