

Pułapki w diagnostyce zakażeń wirusowych zapaleń wątroby na przykładzie wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV) — rola badań potwierdzających

Dane prezentowane podczas seminarium „Postępy w badaniach
przeglądowych dawców krwi” (Warszawa, 5–6 października 2015 r.)

Uncertainty at diagnosis of hepatitis infection on the example of HBV
infection — significance of confirmatory testing. Data presented at the
seminar “Advances in blood donor screening” (Warsaw, 5–6 October 2015)

Aneta Kopacz

Zakład Wirusologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

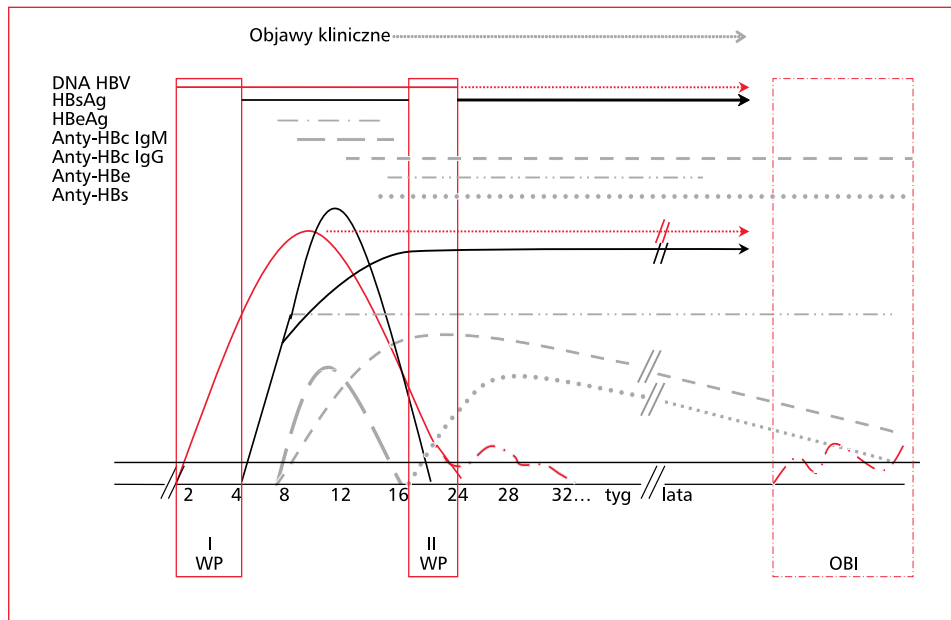
J. Transf. Med. 2016; 9: 10–15

Wstęp

Zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu B (HBV, *hepatitis B virus*) może skutkować zapaleniem, włóknieniem, marskością, a nawet nowotworem wątroby. Typowym objawem infekcji jest żółtaczka, która występuje u około 30% zakażonych. W podobnym odsetku może wystąpić jeden lub kilka z objawów, takich jak: zmęczenie, apatia, objawy grypopodobne, gorączka i bóle brzucha, a u 1/3 zakażenie ma charakter całkowicie bezobjawowy [1]. W diagnostyce zakażeń HBV stosowane są testy wykrywające antygen HBs (HBsAg), DNA HBV, przeciwciała do antygeny rdzeniowego (anty-HBc) klasy IgG i IgM, antygen HBe (HBeAg), przeciwciała do antygeny HBe (anty-HBe). Badanie jak największej liczby znaczników zwiększa prawdopodobieństwo wykrycia infekcji oraz pozwala ustalić jej fazę. Analiza wyników wyżej wymienionych badań ponawianych co 2–4 tygodnie u osoby zakażonej umożliwia określenie wirulencji HBV oraz ustalenie postępowania terapeutycznego [2]. Na rycinie 1 przedstawiono najczęściej obserwo-

waną sekwencję wykrywania we krwi markerów HBV. Podstawowym markerem diagnostycznym w zakażeniu HBV jest antygen HBs. Antygen ten produkowany jest w nadmiarze — występuje zarówno w otoczce wirusa, jak i w białkowych cząstkach nieinfekcyjnych. Na rycinie zaznaczono okresy newralgiczne w diagnostyce zakażenia, kiedy to, mimo toczącej się infekcji, HBsAg nie jest wykrywalny we krwi. Fazy zakażenia obarczone szczególnym ryzykiem niewykrycia HBsAg to: a) I okienko serologiczne (WP, *window period*) — okres około 30 dni po zakończonej fazie eklipsy¹, w którym z hepatocytów wydzielane są do krwioobiegu wiriony, przy czym poziom antygeny HBs we krwi nie przekracza progu detekcji testów diagnostycznych, b) II okienko serologiczne (II WP, *post ramp-up*) — trwający około 10 dni okres eliminacji HBsAg, kiedy poziom markera spada poniżej dolnej granicy detekcji testu i c) ukryte zakażenie HBV (OBI, *occult hepatitis B infection*) — kiedy HBsAg pozostaje niewykrywalny ze względu na zbyt małe stężenie we krwi obwodowej lub/i zmiany konformacyjne antygeny. Markerem pozwalającym

¹Eklipsa — matematycznie teoretycznie wyliczony okres od momentu zakażenia do pojawienia się markerów wirusa we krwi



Rycina 1. Typowa sekwencja wykrywania swoistych markerów zakażenia HBV (w ramkach zaznaczono okresy [HBsAg(-)/DNA HBV(+)])

Figure 1. Typical course of HBV markers ([HBsAg(-)/DNA HBV(+)] periods in frames)

na identyfikację zakażenia w każdym z wyżej opisanych okresów jest DNA HBV. Warto zaznaczyć, że na etapach zakażenia z niewykrywalnym HBsAg (HBsAg-) DNA-emia wirusa we krwi jest niska (od pojedynczych do 10^4 kopii/ml), zatem jego detekcja ściśle zależy od czułości analitycznej stosowanego testu molekularnego [3–5]. W przypadku ukrytych zakażeń, za które obok mutacji w genomie wirusa, odpowiada silna presja immunologiczna gospodarza ograniczająca namnażanie patogenu, poziom DNA HBV we krwi jest niski < 200 IU/ml (najczęściej 5–10 IU/ml). Z tego względu do detekcji OBI konieczne jest stosowanie testów o czułości analitycznej (95% LOD) nie niższej niż 5 IU DNA HBV/ml [4, 6].

Badanie wirusowego DNA ma istotne znaczenie dla prawidłowego zdiagnozowania zakażenia, tym bardziej że istnieją formy HBV, których genom zawiera mutacje skutkujące: a) zmniejszoną produkcją i/lub wydzielaniem białek i/lub antygenów wirusa i odpowiadających im przeciwciał, b) zmienioną konformacją antygenów, c) obniżonym poziomem replikacji. Zmiany te mogą powodować, że zarówno wirusowe antygeny (Ag), jak i/lub wytwarzane do nich przeciwciała (Ab) mogą być niewykrywalne przez serologiczne testy diagnostyczne, co prowadzi do wyników fałszywie ujemnych [7, 8]. Przykładem są zakażenia wywołane szczepami z mutacjami zmieniającymi konformację HBsAg (np. G145R), które charakteryzują się aktywną replikacją wi-

rusa w hepatocytach i wysoką DNA-emią we krwi. Niezaburzona replikacja sprawia, że te formy są łatwe do wykrycia testami NAT (badania kwasów nukleinowych, *nucleic acid testing*) [9].

W tabeli 1 przedstawiono przyczyny braku detekcji poszczególnych markerów swoistych dla zakażenia HBV oraz możliwości wykrycia takich jego form. Zebrane w tabeli dane wskazują, że badanie DNA HBV umożliwia wykrycie większości zakażeń również o nietypowej produkcji Ag i Ab. Należy jednak pamiętać, że przy tak niskich wiremiach, jakie występują w trakcie WP oraz OBI, istnieje prawdopodobieństwo otrzymywania rozbieżnych wyników NAT (w jednej lub kolejnych próbkach pacjenta). Potwierdzeniem wykrycia niskowiremicznego I WP jest detekcja HBsAg i/lub anty-HBc w próbce pobranej od pacjenta/dawcy po około 30 dniach. Niemal we wszystkich próbkach z II WP i zakażeniach utajonych obecne są przeciwciała anty-HBc. Wykrycie przeciwciał anty-HBc klasy IgM oraz IgG pozwala potwierdzić odpowiednio II WP i OBI u osób z rozbieżnymi wynikami badań DNA HBV [10]. Należy podkreślić, że w przypadku otrzymania dodatniego wyniku dla anty-HBc konieczne jest powtórzenie badania testem innego producenta. Postępowanie takie podyktowane jest niską swoistością testów, zazwyczaj znacznie poniżej 99% [11].

Wykrycie zakażenia HBV ma szczególnie istotne znaczenie u osób zakażonych innym wirusem (np.

Tabela 1. Przyczyny wyników fałszywych ujemnych w trakcie badania markerów HBV i sposoby zapobiegania (na podstawie [8, 18, 23])**Table 1.** Negative results of HBV markers in true infection (reasons and prevention of false diagnosis)

Wynik badania	Faza zakażenia	Przyczyna ujemnych wyników badań markerów zakażenia HBV	Badania zwiększające prawdopodobieństwo wykrycia zakażenia
HBsAg(-)	WP I	1. Niski poziom wydzielania do krwi wirionów i HBsAg = poziom HBsAg poniżej czułości testu (początek infekcji lub jej ograniczanie przez mechanizmy układu immunologicznego gospodarza)	Badanie innych swoistych markerów zakażenia, przede wszystkim DNA HBV, testami o czułości 95% LOD: 5 IU/ml Testy HBsAg o wysokiej czułości klinicznej, najnowszych generacji, wykrywające maksymalną liczbę form polimorficznych Badanie HBsAg w hepatocytach
	Ostre zakażenie	2. Zmieniona budowa/konformacja białka HBs — nierozpoznawalna dla testu diagnostycznego, spowodowana mutacjami w genomie wirusa: — w obrębie determinanty „a” (<i>T1126S, Q129H, G130N, S143L, D144A, G145R</i>)	
	WP II	— MHR poza determinantą „a”: (<i>Pro120 na Gly/Thr/Ser/Asn/Gln i T123N, M133L</i>) — w preS/S wynikające z mutacji w nakładającej się ramce odczytu pol/RT3. Osłabiona synteza HBsAg w wyniku obniżonej replikacji (<i>S136P, C139R, D144A</i>)	
	OBI	3. Obniżone/brak wydzielania HBsAg poza zakażony hepatocyt — mutacje w preS2 (<i>D119R, Q129R, G145R, M75T, P178R</i>)	
DNA HBV(-)	WP	1. Zbyt mała czułość testu	Testy w kierunku DNA HBV o czułości 95% LOD: 5 IU/ml
	OBI	2. Miniwiremia z powodu: obniżonej replikacji wynikającej z: — mutacji (<i>S136P, C139R, D144A</i>) — mechanizmów odpornościowych kontrolujących zakażenie	
anty-HBc(-)	WP II	1. Immunotolerancja HBcAg (anergia limf-T, mała liczba specyficznych limf-T we krwi obwodowej, słaba/niewystarczająca prezentacja HBcAg, niska produkcja limfokin przez komórki prezentujące antygen) 2. Immunokompleksy HBcAg-HBcAb (nadprodukcja HBcAg) 3. Nieimmunizujące HBcAg (zmieniona budowa HBcAg w wyniku mutacji w preC/C)	Testy w kierunku: HBsAg, HBeAg, DNA HBV
	Ostre zakażenie		
	OBI		

HCV, HIV) oraz chorych z immunosupresją. Znane są przypadki zarówno znacznego pogorszenia przebiegu klinicznego zakażenia HIV, przewlekłego WZW-C, jak i groźnych powikłań w trakcie choroby nowotworowej, zwłaszcza u pacjentów leczonych immunosupresyjnie, na przykład rituksymabem czy kortykosteroidami. Wielokrotnie wykazano, że w wymienionych wyżej grupach chorych występuje znaczące ryzyko reaktywacji wirusa z formy utajonej, z następstwami obejmującymi nadostre WZW-B [12–14]. Warto podkreślić, że u osób z OBI podczas reaktywacji szybko wzrasta we krwi stężenie materiału genetycznego wirusa, podczas gdy inne swoiste markery mogą być niewykrywalne [14–16].

Zdiagnozowanie HBV między innymi u osób z wyżej wymienionych grup pozwala wprowadzić

właściwe postępowanie przeciwdziałające WZW-B i jego następstwom.

Wykonując badania markerów zakażenia HBV, należy pamiętać, że są one obarczone nie tylko ryzykiem omówionych wyżej wyników fałszywie ujemnych (niewykrycie infekcji), ale także ryzykiem uzyskania wyników fałszywie reaktywnych, które wynikają stąd, że testy diagnostyczne nigdy nie osiągają swoistości 100%. Dlatego każdy reaktywny wynik badania, zwłaszcza HBsAg oraz DNA HBV, wymaga potwierdzenia. Użyteczne jest także wykonywanie oznaczeń w kolejnych pobraniach (próbka kontrolna po kilku dniach, *follow up*) oraz przeanalizowanie wyników badania pozostałych markerów zakażenia. Jednocześnie należy pamiętać, że wykryty HBsAg, nie zawsze świadczy

o zakażeniu; może być spowodowany niedawnym szczepieniem przeciw WZW-B.

Omówione formy zakażenia i problemy związane z ich wykrywaniem pojawiają się również podczas badań przeglądowych dawców krwi. W krwiodawstwie ryzyko wyników fałszywie ujemnych zostaje ograniczone dzięki badaniu u każdego dawcy przy każdym oddaniu krwi i jej składników dwóch markerów zakażenia: DNA HBV i HBsAg. Uzyskany wynik reaktywny w badaniu przeglądowym oznaczany jest jako wstępnie reaktywny (IR, *initially reactive*) i podlega weryfikacji według algorytmu, obejmującego między innymi powtórzenie badania z tej samej próbki.

Przedstawione poniżej sposoby weryfikacji pozwalają dokonać prawidłowej interpretacji wyników badań przeglądowych i ograniczyć liczbę osób podlegających dyskwalifikacji z powodu wyników biologicznie fałszywych.

Stosowane w krwiodawstwie badania weryfikacyjne donacji z wynikiem HBsAg wstępnie reaktywnym i ich rezultaty

Każda próbka z wynikiem HBsAg IR badana jest nazajutrz od pobrania w dwóch powtórzeniach (tym samym testem, którym otrzymano wynik wstępnie reaktywny). Uzyskanie obu wyników ujemnych daje podstawę do uznania wyniku IR za biologicznie fałszywie reaktywny (BFR, *biological false reactive*).

Dla próbki z przynajmniej jednym wynikiem reaktywnym w badaniach powtórzeniowych, czyli próbki powtarzalnie reaktywnej (RR, *repeatable reactive*) wykonywane są testy potwierdzenia — neutralizacja Ag lub badanie DNA HBV. Jeśli wynik testu neutralizacji jest ujemny, zawsze wykonuje się badanie kwasów nukleinowych. Jeśli podstawowym narzędziem weryfikacji jest badanie DNA HBV, a wynik jest ujemny, obligatoryjnie wykonuje się test neutralizacji. Wynik HBsAg RR z dodatnim testem neutralizacji i/lub DNA HBV określany jest jako HBsAg dodatni: HBsAg(+). Wynik badania HBsAg(+) świadczy o zakażeniu, o ile dawca nie był szczepiony w tygodniach poprzedzających badanie. Osoba z wynikiem HBsAg(+) otrzymanym w próbce indeksowej wzywana jest po odbiór wyniku i pobranie próbki *follow up*. W pobranej próbce wykonuje się badanie HBsAg z testem potwierdzenia. Przy tej okazji wypełniana jest ankieta epidemiologiczna zawierająca pytania dotyczące prawdopodobnych źródeł zakażenia oraz uzyskiwane są informacje na temat przebytych szczepień, w szczególności przeciw WZW-B w okresie

poprzedzającym uzyskanie wyniku reaktywnego badania HBsAg [17]. Przedstawiony algorytm postępowania wśród osób z wynikami HBsAg RR pozwala wydzielić grupy: a) zakażonych (wyniki w próbce indeksowej: HBsAg RR potwierdzone w teście neutralizacji lub w badaniu DNA HBV, w próbce *follow up* HBsAg(+), otrzymane u osób, które nie były szczepione przeciw WZW-B w czasie kilku tygodni przed badaniem), b) z wynikami: HBsAg RR/neutralizacja(+)/DNA HBV(–) w próbce indeksowej, które są skutkiem odbytej niedawno immunizacji (ulegający neutralizacji antygen HBs może być wykrywany we krwi nawet przez kilkadziesiąt dni po szczepieniu). Wśród donacji HBsAg RR z wynikiem negatywnym badania DNA HBV (czułość testu 95% LOD > 10 IU/ml) sporadycznie uzyskuje się wynik testu neutralizacji dodatni (u osób, które wykluczyły odbycie immunizacji). Wykrycie antygeny HBs przy ujemnych wynikach DNA HBV może być efektem włączenia regionu genomu kodującego HBsAg do ludzkiego DNA. Zintegrowanie DNA pozwala na ekspresję i wydzielanie białka HBs do krwiobiegu pomimo braku replikacji wirusa w hepatocytach [18, 19].

W latach 2005–2013 w grupie osób z wynikiem HBsAg RR odsetek wyników HBsAg potwierdzonych (tj. dodatnich) wynosił średnio 91% u dawców pierwszorazowych i 9% u wielokrotnych. Dla pozostałych wyników HBsAg RR, odpowiednio 9% (dawcy pierwszorazowi) i 91% (dawcy wielokrotni) uzyskano ujemne wyniki obu testów potwierdzenia — najprawdopodobniej są to wyniki biologicznie fałszywie reaktywne (BFR). Badania weryfikacyjne dla grupy próbek — HBsAg RR/neutralizacja(–) — przeprowadzone w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii z zastosowaniem bardzo czułego testu (test Confirmatory PCR Kit HBV LOD 95% 3,2 IU/ml) nie wykazały obecności DNA HBV w żadnej ze 190 badanych próbek. W 11% z nich wykryto anty-HBcIgG (Architect, Abbott Laboratories, Rungis, France), co sugeruje, że przynajmniej u pozostałych 89% osób — HBsAgRR/neutralizacja(–) — reaktywność HBsAg jest najprawdopodobniej wynikiem nieswoistym, to jest BFR. Dla bezpieczeństwa przetoczeń zaleca się, aby grupa krwiodawców z wynikami HBsAg RR/testy potwierdzenia(–) pozostawała ze statusem „do wyjaśnienia/dyskwalifikacji czasowej” aż do ustąpienia wyników powtarzalnie reaktywnych HBsAg, które — zgodnie z naszymi przypuszczeniami — w większości przypadków mają charakter nieswoisty (BFR). Od takich dawców próbki kontrolne pobierane są nie wcześniej niż po 6 miesiącach.

Badania weryfikacyjne donacji HBsAg ujemnych/reaktywnych w badaniu przeglądowym DNA HBV

Jeśli dla seroujemnej — HBsAg(–) — donacji otrzymano reaktywny wynik badania przeglądowego w kierunku DNA HBV (testy NAT), wykonywanego w pojedynczej próbce, wynik taki podlega weryfikacji. W próbce z reaktywnym wynikiem NAT (IR) oznaczenie testem przeglądowym powtarzane jest dwukrotnie w Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (CKiK). Uzyskanie wyników negatywnych obu powtórzeń pozwala uznać pierwotny wynik badania za fałszywie reaktywny, jednak w trosce o bezpieczeństwo krwi donacja nie zostaje dopuszczona do użytku klinicznego. Dawca nie podlega dyskwalifikacji, przy kolejnej wizycie w Centrum Krwiodawstwa ma wykonywany zestaw obowiązkowych badań przeglądowych (HBsAg i DNA HBV) [20]. Jeśli natomiast donacja w CKiK otrzymała wynik reaktywny w przynajmniej jednym powtórzeniu (RR), podlega ona badaniom potwierdzającym w ośrodku referencyjnym (IHiT, Instytut Hematologii i Transfuzjologii). Wówczas w oddzielnej, nieotwieranej wcześniej próbce, wykonywane są badania DNA HBV oraz badania uzupełniające: anty-HBc i anty-HBs [17]. Prowadzenie badań powtórnych w CKiK, a badań potwierdzających w oddzielnej próbce donacji NAT RR pozwala odróżnić wyniki fałszywie reaktywne (nieswoiste i wynikające z kontaminacji) od prawdziwie reaktywnych (swoistych zakażeniu, potwierdzonych w badaniach IHiT). Zwiększa się dzięki temu pewność stawianej diagnozy. Wykrycie w IHiT materiału genetycznego wirusa i/lub wykrycie anty-HBc (w próbce weryfikowanej) skutkuje uznaniem donacji za „DNA HBV *yield*” (donacja pochodząca z fazy, gdy wykrywalny jest DNA HBV, przy braku detekcji HBsAg [HBsAg-/DNA HBV(+)]), zaś dawcy za zakażonego wirusem HBV. W przypadku rozbieżnych wyników badania NAT między laboratoriami CKiK i IHiT wykrycie anty-HBc kwalifikuje donację do grupy OBI z DNA HBV <5 IU/ml, pod warunkiem wykrycia markerów zakażenia również w kolejnym pobraniu (próbka kontrolna) [21]. Dodatkowo wykrycie każdego DNA HBV *yield* potwierdza się badaniami próbki kontrolnej pobranej przy zgłoszeniu się dawcy po odbiór wyników, podobnie jak ma to miejsce w przypadku otrzymania dla donacji wyniku HBsAg(+). Badania w próbce *follow up* obejmujące DNA HBV, HBsAg, anty-HBc i anty-HBs służą również obserwacji kinetyki zakażenia i określeniu fazy zakażenia. Stosując powyższy algorytm, potwierdzono w latach 2005–2013 zakażenie DNA

HBV *yield* w 160 donacjach. Badania próbek weryfikowanych (indeksowych) i kolejnych (*follow up*) wykazały, że donacje z wynikiem HBsAg(–)/DNA HBV(+) pochodziły z: I WP — 34, II WP — 5, OBI — 121. U 4 osób z zakażeniem wykrytym na etapie I WP obserwowano przełamanie odporności nabytej przez szczepienie (*breakthrough infection*). Informacja o odbytej w przeszłości immunizacji pochodzi z wywiadu przeprowadzonego z dawcami. U wszystkich 4 osób w próbkach pobranych po 7–63 dniach od donacji, w której DNA wirusa było jedynym markerem świadczącym o zakażeniu, stwierdzono obecność przeciwciał anty-HBs (przed lub równoległe z wykryciem HBsAg i/lub anty-HBc). Jak twierdzą Stramer i wsp., taka kolejność wykrywania znaczników jest cechą charakterystyczną dla zjawiska przełamania odporności poimmunizacyjnej [22].

Podsumowanie

Znaczna liczba czynników zmieniających profil i przebieg zakażenia HBV wskazuje na konieczność zastosowania jak największej liczby badań swoistych znaczników, w co najmniej 2 kolejnych próbkach, w celu potwierdzenia lub wykluczenia również nietypowego przebiegu zakażenia oraz uniknięcia pomyłek diagnostycznych w przypadku objawów sugerujących WZW-B i/lub otrzymania pojedynczego reaktywnego wyniku markera HBV. Przy interpretacji wyników należy pamiętać, że swoistość testów jest <100%, wobec czego można uzyskać wyniki biologicznie fałszywie reaktywne (BFR). Aby takie wyniki wykluczyć, należy do każdego wyniku IR wykonać badania powtórne tym samym testem oraz badania potwierdzające (odpowiednim testem potwierdzenia/uzupełniającym/itp.).

Konflikt interesów

Praca powstała na podstawie wykładu wygłoszonego podczas seminarium „Postępy w badaniach przeglądowych dawców krwi” (Warszawa, 5–6 października 2015 r.), organizowanego przez Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o. pod nadzorem merytorycznym Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie.

Piśmiennictwo

1. Juszczyk J. Clinical course and consequences of hepatitis B infection. *Vaccine* 2000; 18: 23–25.
2. WHO, <http://www.who.int/hiv/pub/hepatitis/hepatitis-b-guidelines/en/>.
3. Candotti D. Diagnostic algorithm for HBV safe transfusion. *Blood Transfus.* 2009; 7: 174–182.

4. Raimondo G., Allain J.P., Brunetto M. Statements from the *Taormina* expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2008; 49: 652–657.
5. Kleinman S.H., Lelie N., Busch M.P. Infectivity of human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus and risk of transmission by transfusion. *Transfusion* 2009; 49: 2454–2489.
6. Samal J., Kandpal M., Vivekanandan P. Molecular mechanisms underlying occult hepatitis B virus infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 2012; 25: 142–163.
7. La'ulu S.L., Roberts W.L. The analytic sensitivity and mutant detection capability of six hepatitis B surface antigen assays. *Am. J. Clin. Pathol.* 2006; 125: 748–751.
8. Pollicino T., Cacciola I., Saffioti F., Raimondo G. Hepatitis B virus PreS/S gene variants: Pathobiology and clinical implications. *J. Hepatol.* 2014; 61: 408–417.
9. Levicnik-Stezinar S. Hepatitis B surface antigen escape mutant in a first time blood donor potentially missed by a routine screening assay. *Clin. Lab.* 2004; 50: 49–51.
10. Candotti D., Allain J.P. Transfusion-transmitted hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2009; 51: 798–809.
11. Juhl D., Luhm J., Görg S. i wsp. Evaluation of algorithms for the diagnostic assessment and the reentry of blood donors who tested reactive for antibodies against hepatitis B core antigen. *Transfusion* 2011; 51: 1477–1485.
12. Bagaglio S., Albarello L., Biswas P. i wsp. Virological pattern of hepatitis B infection in an HIV-positive man with fatal fulminant hepatitis B: a case report. *J. Med. Case. Rep.* 2009; 3: 110.
13. Konstantinou D., Deutsch M. The spectrum of HBV/HCV coinfection: epidemiology, clinical characteristic, viral interactions and management. *Ann. Gastroenterol.* 2015; 28: 221–228.
14. Oketani M., Ido A., Uto H., Tsubouchi H. Prevention of hepatitis B virus reactivation in patients receiving immunosuppressive therapy or chemotherapy. *Hepatology Research* 2012; 42: 627–663.
15. Awerkiew S., Däumer M., Reiser M. i wsp. Reactivation of an occult hepatitis B virus escape mutant in an anti-HBs positive, anti-HBc negative lymphoma patient. *J. Clin. Virol.* 2007; 38: 83–86.
16. Brojer E. Ukryte zakażenie wirusem HBV w hematologii i transfuzjologii. *Acta Haematologica Polonica* 2009; 40: 435–449.
17. Łętowska M. Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi. Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa 2014.
18. Hudu S.A., Malik Y.A., Niazlin M.T. i wsp. An Overview of Hepatitis B Virus Surface Antigen Mutant in the Asia Pacific. *Curr. Issues. Mol. Biol.* 2014; 16: 69–78.
19. Bréchet C. Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms. *Gastroenterology* 2004; 127 (supl. 1): 56–61.
20. Gou H., Pan Y., Ge H. i wsp. Evaluation of an individual-donation nucleic acid amplification testing algorithm for detecting hepatitis B virus infection in Chinese blood donors. *Transfusion* 2015; 55: 2272–2281.
21. Kiely P., Margaritis A.R., Seed C.R., Yang H. Australian Red Cross Blood Service NAT Study Group. Hepatitis B virus nucleic acid amplification testing of Australian blood donors highlights the complexity of confirming occult hepatitis B virus infection. *Transfusion* 2014; 54: 2084–2091.
22. Stramer S.L., Wend U., Candotti D. i wsp. Nucleic Acid Testing to Detect HBV Infection in Blood Donors. *N. Engl. J. Med.* 2011; 364: 236–247.
23. El Chaar M., Candotti D., Crowther R.A., Allain J.P. Impact of hepatitis B virus surface protein mutations on the diagnosis of occult hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2010; 52: 1600–1610.