

Metodyka identyfikacji zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu B u dawców krwi w Polsce w latach 2005–2020

Aneta Kopacz^{ORCID}, Piotr Grabarczyk^{ORCID}

Zakład Wirusologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Kopacz A, Grabarczyk P. Strategies for hepatitis B virus screening of Polish blood donors (2005–2020). *J Transf Med* 2021; 14 (2): 73–86. DOI: 10.5603/JTM.2021.0005.

Należy cytować wersję pierwotną.

Streszczenie

W celu zmniejszenia ryzyka przeniesienia wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV) przez przetoczenie krwi i jej pochodnych każda donacja jest badana w kierunku markerów zakażenia tym wirusem. Niemal na całym świecie obowiązuje badanie HBsAg, w kilku krajach dodatkowo badane są przeciwciała anti-HBc, a w kilkudziesięciu HBV DNA. To ostatnie badanie wykonuje się, używając różnych strategii (od badań pojedynczych donacji do miniipul złożonych z 96 donacji). W krajach stosujących szczepienia przeciw wirusowemu zapaleniu wątroby typu B obserwuje się spadek częstości zakażeń HBsAg-dodatnich i rozpoczyna się dyskusja dotycząca właściwego doboru i strategii badań przeglądowych u dawców krwi.

W polskim krwiodawstwie od 1971 roku przeglądowo w każdej donacji wykonuje się badanie HBsAg. Stosowane testy serologiczne zgodnie z wytycznymi Rady Europy cechują się czułością umożliwiającą wykrycie co najmniej 0,13 IU/ml HBsAg (tzw. zakażenia HBsAg-dodatnie). W celu dalszego zmniejszenia ryzyka przeniesienia zakażenia HBV przez przetoczenie, od roku 2005, do panelu badań przeglądowych dodano badanie HBV DNA, które umożliwia wykrycie zakażenia u dawców HBsAg-ujemnych.

Określenie właściwego dla Polski panelu badań przeglądowych wymaga, między innymi zestawienia dotychczas wykorzystywanych strategii badań przeglądowych HBV. Niniejsze podsumowanie, które powstało na podstawie części rozprawy doktorskiej autorki, stanowi wstęp do określenia efektywności stosowanych metod oraz wskazania optymalnego panelu badań HBV u polskich krwiodawców.

Słowa kluczowe: wirus zapalenia wątroby typu B, badania przeglądowe HBV, HBsAg, HBV DNA

J. Transf. Med. 2021; 14: 58–72

Adres do korespondencji: dr n. med. Aneta Kopacz, Zakład Wirusologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Chocimska 5, 00–957 Warszawa, e-mail: akopacz@ihit.waw.pl

Artykuł jest dostępny bezpłatnie na podstawie licencji Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) umożliwiającej jego pobranie oraz udostępnianie pod warunkiem wskazania autorstwa i wydawcy. Niedopuszczalne jest wprowadzanie jakichkolwiek zmian lub wykorzystanie komercyjne bez zgody wydawcy.

Wstęp

Wirus zapalenia wątroby typu B (HBV, *hepatitis B virus*) wywołuje ostre, nadostre i przewlekłe zapalenie wątroby. Zakażenie HBV stanowi jeden z istotniejszych obecnie problemów klinicznych i epidemiologicznych na świecie [1]. Wirus jest przenoszony wraz z krwią, nasieniem i innymi płynami ustrojowymi osoby zakażonej. Ze względu na wysoką zakaźność HBV przez krew instytucje związane z krwiodawstwem były i są aktywnie zaangażowane w kontrolę ryzyka przeniesienia tego wirusa przez transfuzję krwi i jej składników (TT-HBV, *transfusion transmission HBV*) oraz produktów krwiopochodnych. Udowodniono, że najbardziej zakaźna jest krew z faz z wykrywalnym antygenem powierzchniowym HBV — HBs (HBsAg) i najwyższą wiremią (charakterystycznymi dla objawowego zapalenia wątroby typu B), jednak przeniesienie HBV może również nastąpić przez krew pochodzącą z faz bez wykrywalnego HBsAg — najczęściej przebiegających z niższą wiremią i bezobjawowo [2]. Pierwszym sposobem ograniczania ryzyka TT-HBV w krwiodawstwie jest kwalifikacja dawcy (na podstawie wywiadu i badania lekarskiego). Około 60% osób przechodzi zakażenie skąpo- lub bezobjawowo, zatem mimo stosowania procedur kwalifikacji dawcy, HBV pozostaje czynnikiem ryzyka potransfuzyjnego zapalenia wątroby typu B. W ostatnich kilkunastu latach intensywnie opracowywane są metody inaktywacji patogenów w składnikach krwi, niestety ich użycie wciąż jest ograniczone i nie w pełni efektywne [3, 4].

W celu zmniejszenia ryzyka przenoszenia HBV przez krew i jej składniki na świecie dostępne są metody badań przeglądowych HBsAg, HBV DNA i anty-HBc (przeciwciała przeciw antygenowi rdzeniowemu HBV — HBcAg). Badanie HBsAg pozwala wykryć zakażenie ostre i przewlekłe, ale ze względu na ograniczoną czułość nie wszystkie jego fazy i formy [5]. Obowiązek badania antygeny HBs w każdej pojedynczej donacji nakłada Dyrektywa 2002/98/WE Parlamentu Europejskiego, określająca normy jakości i bezpieczeństwa dla pobierania, badania, preparatyki, przechowywania i wydawania krwi ludzkiej i jej składników; badania te zaleca również Rada Europy [6, 7]. Z kolei coraz powszechniejsze od 2002 roku badanie HBV DNA pozwala zidentyfikować obok faz HBsAg-dodatnich (z wykrywalnym HBsAg) również fazy HBsAg-ujemne (z niewykrywalnym HBsAg). Badanie kwasu nukleinowego (NAT, *nucleic acid testing*) HBV wykonuje się w około 40 krajach, przy użyciu

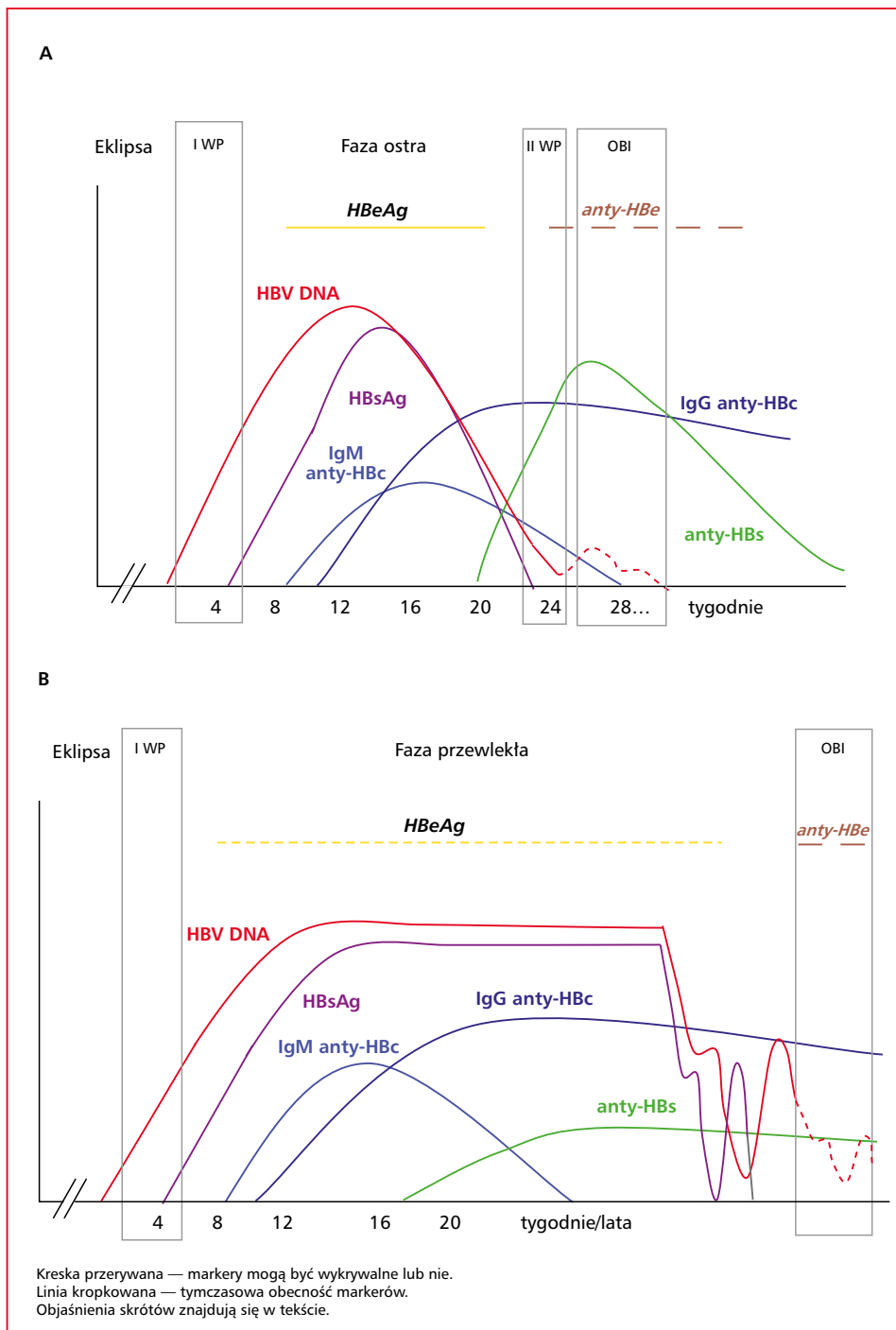
różnych strategii: od badania pojedynczych donacji (IDT, *individual donation testing*) do minipool złożeń z 96 donacji (MP, *minipools*) [8]. W kilku krajach Europy, w Stanach Zjednoczonych i Japonii każda donacja badana jest dodatkowo w kierunku anty-HBc — markera trwającego, ale także przebytego zakażenia.

Wzrost jakości (m.in. czułości i swoistości) oraz dostępności badań poszczególnych markerów i możliwość identyfikacji za ich pomocą różnych faz zakażenia doprowadziły do rozpoczęcia dyskusji nad optymalnym doбором badań przeglądowych (markerów i algorytmów) wykrywających największą liczbę zakażonych [9, 10], przy jednoczesnej dbałości o zapewnienie dostępności krwi do przetoczeń, czyli nieodsuvanie od oddawania krwi osób, których krew nie jest źródłem wirusa.

Przed przystąpieniem do tej dyskusji w Polsce w niniejszej pracy przedstawiono stosowane dotychczas metody i algorytmy badań w kierunku antygeny HBs oraz HBV DNA w poszczególnych Centrach Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (CKiK).

Przebieg zakażenia HBV — markery we krwi

Zakażenie HBV jest procesem dynamicznym, a jego przebieg i wykrywanie poszczególnych markerów zależą od wirulencji HBV oraz reakcji układu immunologicznego gospodarza (ryc. 1) [11]. Niezależnie od tego, czy zakażenie przebiegnie bezobjawowo, przyjmie kliniczną postać ostrą czy przewlekłą, kolejność pojawiania się markerów HBV we krwi w pierwszych kilku tygodniach po fazie eklipsy jest podobna [12]. W pierwszych tygodniach po zakażeniu następują replikacja wirusa oraz intensywna produkcja jego białek (przyrost wiremii w wątrobie), znajdująca odzwierciedlenie w pojawieniu się i wzroście stężenia HBV DNA i HBsAg we krwi. Okres pierwszych tygodni zakażenia do momentu osiągnięcia poziomu wykrywalności HBsAg nazywany jest I oknem serologicznym (WP, *window period*) [13, 14]. Od około 6. tygodnia wykrywane są przeciwciała anty-HBc: najpierw klasy immunoglobulin typu M (IgM), a następnie immunoglobulin typu G (IgG). Wysokie stężenie przeciwciał anty-HBc IgM utrzymuje się przez 2–6 miesięcy i jest charakterystyczne dla zakażenia ostrego [15]. W zakażeniu ostrym poziom aktywności aminotransferazy alaninowej (AIAT, *alanine aminotransferase*) jest podwyższony, mogą też wystąpić objawy żółtaczki i grypopodobne [16]. Może ono również przebiegać bezobjawowo, co jest ważne z punktu widzenia krwiodawstwa.



Rycina 1. Przebieg zakażenia HBV (z zaznaczeniem faz I WP, II WP i OBI [14, 21]). **A.** Zakażenie ostre; **B.** Zakażenie przewlekłe

Jeśli zakażenie w fazie ostrej ulega samoograniczeniu, w okresie 6 miesięcy HBsAg przestaje być wykrywalny we krwi. Ustępują wówczas objawy kliniczne (w tym wirusowe zapalenie wątroby typu B — WZW B), jeśli towarzyszyły wirerii, a parametry laboratoryjne (np. poziom aktywności AIAT), o ile były podwyższone, ulegają normalizacji.

Okres spadków wirerii z niewykrywalnym HBsAg przy obecnych przeciwciałach anti-HBc IgM i niskim poziomie HBV DNA nazywane jest II oknem serologicznym (II WP). Najczęściej po II WP we krwi nieobecne są również HBV DNA i antygen — HBeAg. Wykrywalne pozostają przeciwciała: anti-HBc z lub bez anti-HBe i anti-HBs

[14]. Utrzymująca się obecność HBsAg bez HBV DNA może świadczyć o ograniczeniu zakażenia, któremu towarzyszyła integracja fragmentu pre-S/S do genomu gospodarza [17, 18]. Z kolei przedłużająca się obecność HBV DNA w stężeniu poniżej 200 IU/ml, przy niewykrywalnym HBsAg z obecnymi lub nieobecnymi anty-HBc i/lub anty-HBs we krwi oznacza niepełną kontrolę układu immunologicznego nad replikacją wirusa, tj. przejście w fazę zakażenia ukrytego (OBI, *occult hepatitis B infection*) [17, 19].

Jeśli nie dochodzi do ograniczenia zakażenia, HBsAg i HBV DNA pozostają obecne we krwi przez okres dłuższy niż 6 miesięcy i zakażenie przyjmuje postać przewlekłą. Przez miesiące/lata wykrywane są HBsAg i anty-HBc z lub bez HBV DNA i HBeAg. Przeciwciała anty-HBe i anty-HBs mogą być niewykrywalne, a zakażenie przebiegać okresowo bezobjawowo. Zakażenie z fazy przewlekłej, podobnie jak ostrej, może zostać ograniczone do postaci nosicielstwa HBsAg z niewykrywalnym HBV DNA lub zakażenia ukrytego [19, 20].

Markery zakażenia HBV badane przeglądowo u krwiodawców

HBsAg

Pierwszym serologicznym markerem zakażenia HBV, wykrywalnym metodami immunologicznymi, jest antygen HBs. Detekcja HBsAg we krwi przy użyciu powszechnie stosowanych testów o czułości 0,05–0,5 IU/ml jest możliwa od około 4. tygodnia (2.–10. tydz.) po zakażeniu [15]. Korelitz i wsp. oszacowali, że w zakażeniu ostrym, które ulega ograniczeniu, HBsAg jest wykrywany średnio przez 63 dni. Spadek stężenia HBsAg następuje między innymi w wyniku neutralizującego działania przeciwciał anty-HBs [14, 22]. Występowanie antygenu HBs w fazie ostrej i przewlekłej zakażenia sprawia, że jest on najważniejszym markerem serologicznym z punktu widzenia zarówno diagnostyki, jak i transfuzjologii. Zgodnie z zaleceniami Rady Europy testy przeglądowe muszą wykrywać we krwi co najmniej 0,13 IU HBsAg/ml [7]. Czułość analityczna testu HBsAg weryfikowana jest na podstawie badania paneli międzynarodowych (IS, *International Standard*; PEI, *Paul Ehrlich-Institut*). Przeprowadzona przez Scheiblauera i wsp. analiza 70 testów HBsAg wykazała, że tylko 23/51 testów immunoenzymatycznych (EIA, *enzyme immunoassay*) i 0/17 testów szybkich cechowało się czułością $\leq 0,13$ IU/ml w badaniu PEI HBsAg Standard subtyp ad. Ponadto badanie panelu najczęściej występujących genotypów HBV (A–F) wskazało, że

czułość testów była różna w stosunku do poszczególnych genotypów. Aż 6 spośród 23 ocenianych testów wykrywających 0,13 IU HBsAg PEI/ml wykazywało się niższą czułością w stosunku do 2 lub więcej badanych genotypów. Scheiblauer i wsp. wykazali również, że czułość testów HBsAg może być różna w stosunku do mutantów HBV. Znane są mutacje w genomie HBV skutkujące zmianami aminokwasowymi, np. M133L, P105R, T131L, Q101H, S143L, które powodują, że HBsAg jest niewykrywalny w teście również cechującym się czułością $\leq 0,13$ IU/ml lub prawdopodobieństwo jego wykrycia jest niższe niż IS [23]. W celu możliwości wykrycia jak największej liczby form polimorficznych HBV wybór testu przeglądowego powinien zatem być poprzedzony analizą czułości testu względem jak największej liczby mutantów HBV. W latach 2017 i 2018 opisano nowe metody immunoenzymatyczne o czułości 0,0005–0,005 IU HBsAg/ml. Deguchi i wsp. oraz Shinkai i wsp. wskazują, że najnowsze testy HBsAg pozwalają wykryć wirus z efektywnością zbliżoną do testów NAT. Dotychczas nie oceniono jednak ich skuteczności w krwiodawstwie [24, 25].

anty-HBc

Ważnym markerem diagnostycznym zakażenia HBV są przeciwciała (anty-HBc) skierowane przeciw antygenowi rdzeniowemu wirusa (HBeAg). Anty-HBc pojawiają się 1–2 tygodnie po HBsAg, początkowo są to przeciwciała klasy IgM. Następnie wykrywane są przeciwciała o tej samej swoistości, należące do klasy IgG. Przeciwciała IgG są uważane za trwałe marker zakażenia. Anty-HBc klasy IgM utrzymują się przez 2–6 miesięcy w ostrej fazie zakażenia i przez jej dłuższy czas ich stężenie jest wysokie [4]. Anty-HBc IgM mogą się również pojawić u osób przewlekle zakażonych w fazach zaostrzenia WZW B, jednak wówczas ich stężenie jest niższe niż w ostrej fazie zakażenia [4, 15]. W piorunującym zapaleniu wątroby typu B, przy wzmożonej odpowiedzi immunologicznej, eliminującej hepatocyty z namnażanym HBV, przeciwciała anty-HBc klasy IgM mogą być jedynym wykrywanym markerem serologicznym zakażenia. Obserwowane są również zakażenia, w których nie wykrywa się anty-HBc [26, 27].

Badanie anty-HBc jako badanie przeglądowe u krwiodawców wykonywane jest w niektórych krajach, głównie o niskiej endemiczności. Przyczyny rzadkiego wykorzystywania tego badania to niska swoistość testów, szacowana na 16–75%, oraz trudności w interpretacji wyników, spowodowane brakiem testu potwierdzenia. Brak wyklu-

czenia wyniku fałszywie reaktywnego prowadzi do niepotrzebnego odsuwania dawców. W krajach o wysokiej i średniej endemiczności nie wykonuje się badań anti-HBc, gdyż liczba krwiodawców z wykrywanymi przeciwciałami anti-HBc bez HBsAg w ogólnej populacji dawców przekracza 5%. Dyskwalifikacja dawców z wykrytym anti-HBc prowadziłaby w tych regionach do zmniejszenia dostępności krwi i jej składników [28].

Marker molekularny — HBV DNA

HBV DNA jest obecne we krwi w większości faz zakażenia przy zachodzącej w wątrobie replikacji wirusa [21, 29, 30]. Dzięki molekularnym testom diagnostycznym opartym na technice amplifikacji przez transkrypcję (TMA, *transcription mediated amplification*) oraz technice łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*) o wysokiej czułości [95-procentowy limit detekcji (LOD, *limit of detection*) poniżej 200 IU HBV DNA/ml osocza] zakażenie HBV można wykryć nie tylko w fazach HBsAg-dodatnich, ale również HBsAg-ujemnych (bez wykrywalnego HBsAg) — WP i OBI [31–34]. Za pomocą badań NAT możliwa jest również identyfikacja form polimorficznych HBV niewykrywalnych w badaniu HBsAg, m.in. ze względu na zmienioną konformację tego antygeny, wywołaną przez tzw. mutacje ucieczki [35]. Dyrektywa 2002/98/WE Parlamentu Europejskiego i Rady nie nakłada w krajach UE obowiązku wykonywania badań HBV DNA u krwiodawców, są one jednak rekomendowane przez Radę Europy i wprowadzane w krajach zarówno o wysokiej, jak i niskiej endemiczności, gdyż dzięki identyfikacji zakażenia HBsAg-ujemnego zmniejsza się ryzyko TT-HBV [6, 7, 36].

HBV DNA we krwi we wczesnych HBsAg-ujemnych fazach zakażenia

Spośród obecnie dostępnych badań diagnostycznych HBV testy oparte na namnażaniu materiału genetycznego (PCR, TMA) umożliwiają identyfikację zakażenia jeszcze przed wykryciem HBsAg, tj. w tzw. I WP [14]. Tempo podwajania liczby wirionów HBV wynosi średnio około 2,6 (2,2–15,2) dnia i jest relatywnie niskie w porównaniu np. z ludzkim wirusem niedoboru odporności (HIV, *human immunodeficiency virus*) czy wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV, *hepatitis C virus*). Wolne tempo namnażania HBV sprawia, że okres jaki musi minąć, aby stężenie wirusa osiągnęło poziom wykrywalności metodami diagnostycznymi we krwi, jest relatywnie długi [2]. Prawdopodobieństwo wykrycia HBV DNA w I WP zależy zatem od czułości testu [29]. Przy użyciu metody NAT

o czułości 3,4 IU/ml materiał genetyczny HBV można wykryć nawet 3 tygodnie przed antygenem HBs, jeśli badanie antygeny HBs wykonywane jest za pomocą testu o czułości nie mniejszej niż 0,13 IU/ml [37]. Wykrycie HBsAg po około 4 tygodniach namnażania wirusa, tj. kiedy stężenie HBV DNA przekracza 3×10^2 IU/ml, oznacza koniec okna serologicznego [38, 39].

U osób, u których następuje samoograniczenie zakażenia ostrego, średnio po 2 miesiącach obecności HBsAg we krwi, stężenie DNA ulega zmniejszeniu o połowę co 1,6 (0,9–6,3) dnia [13]. Proces redukcji wirerii wiąże się z serokonwersją w układach HBe i HBs (produkcją przeciwciał anti-HBe i anti-HBs) oraz neutralizacją cząstek zawierających HBsAg [15]. Efektywne ograniczenie zakażenia zachodzi przez trwające około 10 dni II WP, w którym przy stężeniu HBV DNA poniżej 10^3 IU/ml i obecnych przeciwciał anti-HBc obu klas antygen HBs jest niewykrywalny. Vermeulen i wsp. oszacowali za pomocą modelowania matematycznego, że przy wykorzystaniu badania NAT o czułości 3,4 IU/ml (95% LOD) materiał genetyczny wirusa powinien być wykrywany przez 8,7 spośród 10 dni II WP [14].

HBV DNA w zakażeniu ukrytym

Zakażenie ukryte (OBI) to forma zakażenia charakteryzująca się obecnością replikacyjnie aktywnego HBV DNA w wątrobie, czemu towarzyszy obecność lub brak HBV DNA we krwi obwodowej u osób z niewykrywalnym HBsAg, niezależnie od obecności anti-HBc i/lub anti-HBs [40, 41]. W przypadku OBI stężenie HBV DNA we krwi może się zmieniać, co skutkuje naprzemienną detekcją DNA-emii i jej brakiem co kilka tygodni/miesiący/lat [42–44]. W większości zidentyfikowanych zakażeń ukrytych DNA-emia we krwi nie przekracza 200 IU/ml. Analizując markery serologiczne w OBI, stwierdzono, że w co najmniej 80% przypadków tego zakażenia obecne są anti-HBc i/lub anti-HBs (tzw. serododatnie OBI), a w 1–20% przypadków przeciwciała nie są wykrywalne (tzw. seroujemne OBI) [40, 41]. W ponad 90% serododatnich OBI wykrywalne są przeciwciała anti-HBc z lub bez anti-HBs. W pozostałych kilku procentach serododatnich OBI wykrywalne są przeciwciała anti-HBs bez anti-HBc — są to tzw. OBI z obecnym tylko anti-HBs [34].

Ryzyko przeniesienia HBV przez transfuzję i metody jego ograniczania

Szacuje się, że do 1970 roku na świecie zakażenie przez składnik krwi nastąpiło u około

6% osób poddawanych wielu transfuzjom. Wprowadzenie dyskwalifikacji kandydatów na dawców oraz dawców, którzy zgłosili w ankiecie poprzedzającej donację lub podczas wywiadu lekarskiego przebycie WZW B bądź zachowania i okoliczności związane ze zwiększonym ryzykiem zakażenia, oraz zastosowanie badań przeglądowych HBsAg spowodowały zmniejszenie ryzyka TT-HBV do 0,6–2,22/mln donacji w krajach o niskiej endemiczności oraz do 22,9–45,5/mln donacji w krajach o wysokiej endemiczności [10]. Przy wprowadzeniu dodatkowo przeglądowych badań HBV DNA szacuje się, że pozostające ryzyko resztkowe TT-HBV jest kilkukrotnie niższe: w granicach 0,13–0,6/mln donacji w krajach o niskiej endemiczności i ponad 100/mln donacji w krajach o wysokiej endemiczności. Dotychczas wykazano, że ryzyko TT-HBV zależy od sytuacji epidemiologicznej wśród dawców, czułości badań przeglądowych i zastosowanych modeli matematycznych do szacowania ryzyka [10, 28]. Ostatnie analizy OBI wskazują, że częstość TT-HBV w Polsce znacznie przekracza wartość 0,6/mln donacji i jest jedną z wyższych na świecie [10].

Badania przeglądowe w kierunku HBV u krwiodawców w Polsce w latach 2005–2020

W latach 2005–2020 identyfikacji zakażeń HBV u krwiodawców w Polsce dokonywano na podstawie wyniku prowadzonych w CKiK badań przeglądowych HBsAg i HBV DNA. Badania przeglądowe realizowano zgodnie z zaleceniami Instytutu Hematologii i Transfuzjologii (IHiT) w Warszawie, opisywanymi szczegółowo od 2006 roku w kolejnych wersjach *Medycznych zasad pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujących w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi* oraz w *Obwieszczeniu Ministra Zdrowia z dnia 9 czerwca 2017 r. w sprawie wymagań dobrej praktyki pobierania krwi i jej składników, badania, preparatyki, przechowywania, wydawania i transportu dla jednostek organizacyjnych publicznej służby krwi* wraz z późniejszymi zmianami [45–48]. HBsAg badano zawsze w pojedynczej donacji, a HBV DNA w pojedynczej donacji lub puli powstałej po zlaniu równych porcji osocza z *n* próbek dawców (*n* = 24 lub 8, lub 6, lub 4).

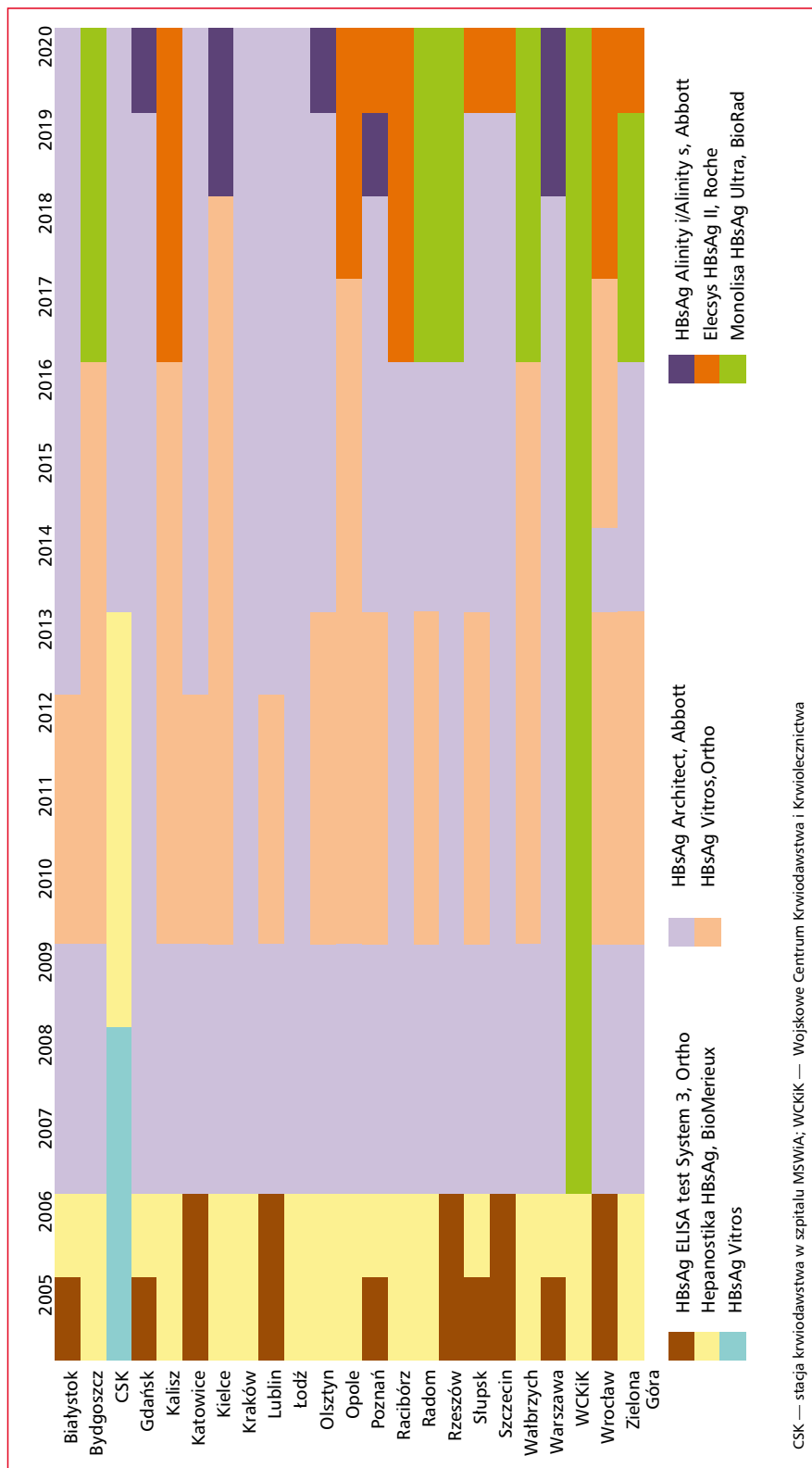
Badania przeglądowe HBsAg

W latach 2005–2008 badania przeglądowe antygeny HBs wykonywano w pojedynczej donacji testami immunoenzymatycznymi: Hepanostica Uniform II (BioMerieux, Lyon, Francja) lub EIA

System 3 (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ, USA). Od roku 2007 zastępowano je sukcesywnie testami chemiluminescencyjnymi (CMIA, *chemiluminescent microparticle immunoassay*) Architect HBsAg Qualitative lub Quantitative (Abbott Diagnostics, Niemcy), od 2010 również Vitros HBsAg ES (Ortho Clinical Diagnostics Inc., NJ, USA). Od 2017 roku CKiK zaczęły zmieniać dotychczasowe testy na oparte na metodzie elektrochemiluminescencji (ECLIA, *electrochemiluminescence immunoassay*) Elecsys (Roche Diagnostics GmbH, Niemcy) oraz Monolisa HBsAg Ultra (Bio-Rad, Francja). Zgodnie z rekomendacjami CKiK kupowały testy w przetargach i stosowały je w różnych okresach (ryc. 2). Wszystkie wykorzystywane testy cechowały się czułością analityczną pozwalającą wykryć co najmniej 0,13 IU HBsAg serotypu ad PEI/ml. Badania czułości klinicznej wykonane dla tych testów przez Scheiblauera i wsp. wykazały, że była ona różna dla genotypów A–F, jednak we wszystkich testach poza Ortho EIA System 3 pozwalała wykryć 0,13 IU HBsAg/ml (ryc. 3). Test Ortho EIA System 3 cechował się czułością obniżoną w stosunku do genotypu B serotypów ayw1 oraz adw2, niepozwalającą wykryć 0,13 IU HBsAg/ml w dwóch badanych próbkach. Należy jednak zauważyć, że test Ortho, podobnie jak pozostałe wymienione, wykrył zakażenie we wszystkich 146 HBsAg-dodatnich próbkach panelu genotypów, w tym 12 B/adw2 i 17 B/ayw1 oraz formy polimorficzne z mutacjami *M133L* (0,21 IU/ml), *P105R* (0,22 IU/ml), *T131L* (0,36 IU/ml), *Q101H* (72 IU/ml), *S143L* (> 8000 IU/ml) [23].

Od roku 2005 w polskim krwiodawstwie wykonuje się obowiązkowe badania HBV DNA. Zmiany metodyki badań przeglądowych HBsAg w latach 2005–2020 przedstawia rycina 2, a HBV DNA— rycina 4. Wprowadzone algorytmy badań przeglądowych i potwierdzających zakażenie HBV wykorzystują metody zarówno serologiczne, jak i molekularne.

Po uzyskaniu wyniku reaktywnego HBsAg w badaniu przeglądowym próbkę oznaczano jako wstępnie reaktywną (IR, *initial reactive*) i zgodnie z obowiązującym algorytmem badanie powtarzano dwukrotnie w tej samej próbce. Jeśli wyniki obu powtórzeń były ujemne, wynik IR uznawano za biologicznie fałszywie reaktywny (BFR, *biological false reactive*) i jeśli nie wykryto HBV DNA w badaniu przeglądowym, donacja taka mogła zostać wykorzystana do celów leczniczych. Otrzymanie co najmniej dwóch wyników reaktywnych na trzy wykonane badania HBsAg oznaczało, że uzyskano wynik powtarzalnie reaktywny; w konsekwencji



Rycina 2. Metodyka badań przeglądowych HBsAg stosowana w polskim krwiodawstwie w latach 2005–2020



Rycina 3. Czulość kliniczna testów HBsAg stosowanych w CKiK w latach 2005–2020 [23]

taka donacja nie mogła zostać wykorzystana do celów klinicznych. W tej sytuacji uruchamiano procedurę potwierdzenia (test neutralizacji i/lub badanie indywidualnej donacji na obecność HBV DNA). Dodatni wynik testu potwierdzenia uwierzytelniał obecność antygeny HBs w badanej próbce.

Badanie przeglądowe HBV DNA

Badania HBV DNA wykonywano w CKiK według dwóch alternatywnych strategii: w indywidualnej donacji (ID, *individual donation*) lub w minipulach (MP) powstałych przez zlanie porcji osocza z 24 (MP24) lub 8 (MP8), lub 6 (MP6), lub 4 (MP4) donacji.

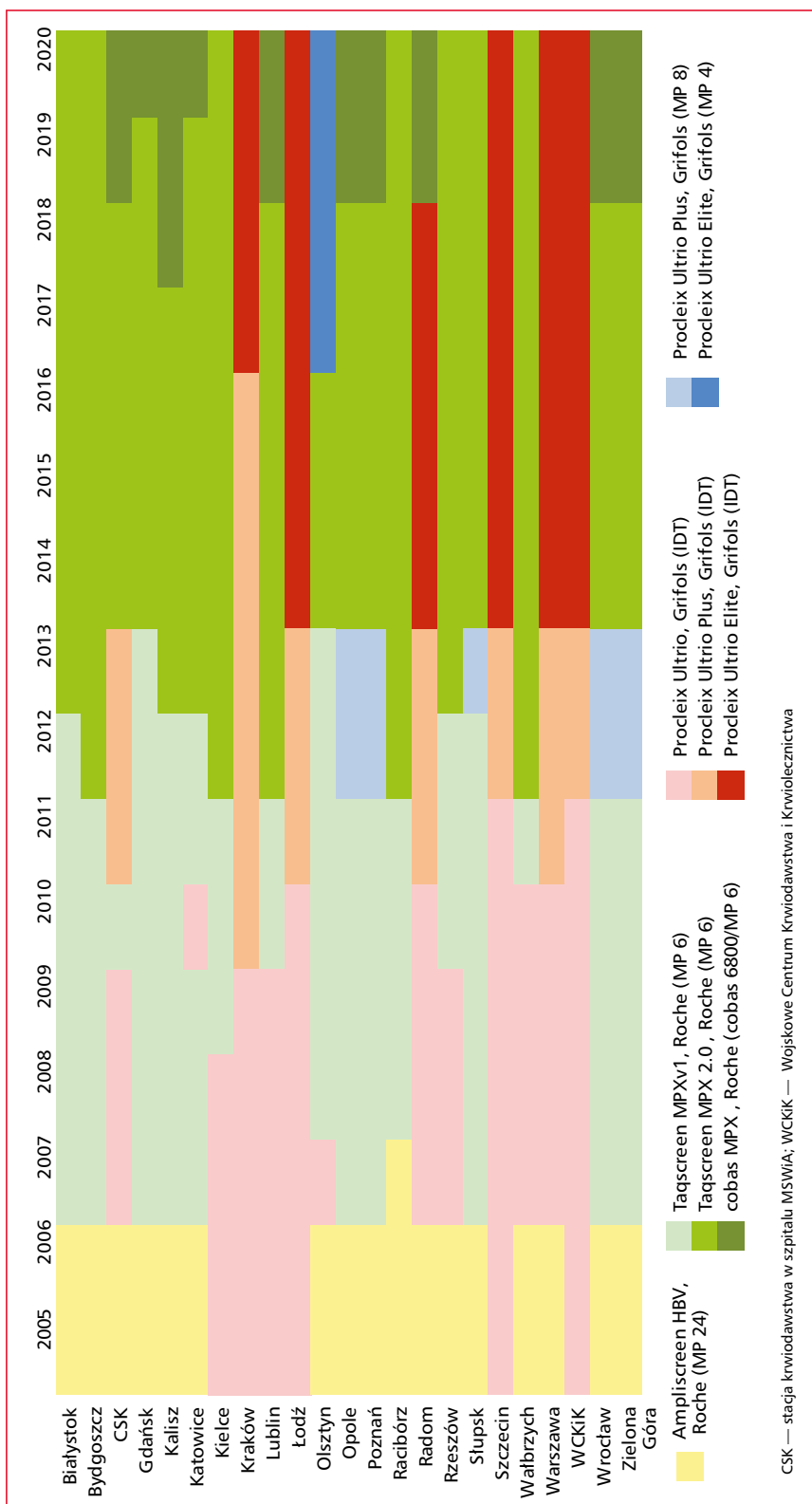
W niniejszym artykule czulość stosowanych testów NAT oraz czulość formatu badań (IDT/ /puli) dla wykrycia zakażenia w osoczu dawcy — po uwzględnieniu rozcieńczenia przez donacje wchodzące w skład puli — przedstawiono jako 95% LoD.

Badania pojedynczych donacji wykonywano testami TMA, a w pulach — testami PCR i TMA (ryc. 4). Badanie w pulach z 24 donacji było wyko-

nywane przy użyciu testu Ampliscreen HBV, który wykrywał tylko HBV DNA. Pozostałe testy były typu multipleks, tzn. wykrywały jednocześnie trzy wirusy (HBV, HCV i HIV) i w celu określenia, który wirus został wykryty, wszystkie — poza Taqscreen MPXv2 i cobas MPX (wskazującymi wykrytego wirusa) — wymagały wykonania dodatkowych badań różnicujących (tab. 1).

Wyboru testów i systemów badań dokonywały CKiK w procedurach przetargowych, opierając się na wytycznych zalecających od 2011 roku wykrywanie 24 IU HBV DNA/ml w donacji [47–48].

W latach 2005–2020 czulość testów opartych na PCR wzrosła z 4,4 do 1,4 IU/ml, a czulość badań (czulość dla donacji wchodzącej w skład puli) ze 105,6 do 8,4 IU/ml. Wzrost czulości badania wykorzystującego PCR w 2007 roku wynikał zarówno ze zmiany testu z Ampliscreen HBV (95% LOD 4,4 IU/ml) na Taqscreen MPXv1 (3,8 IU/ml), jak i ze zmniejszenia wielkości badanej puli ze złożonej z 24 donacji na złożoną z 6 donacji. W kolejnych latach wzrost czulości badań wykonywanych w MP6,



Rycina 4. Metodyka badań przeglądowych HBV DNA stosowana w polskim krwiodawstwie w latach 2005–2020

Tabela 1. Charakterystyka badań przeglądowych HBV DNA w CKiK oraz badań weryfikacyjnych w CKiK i IHIT w latach 2005–2020

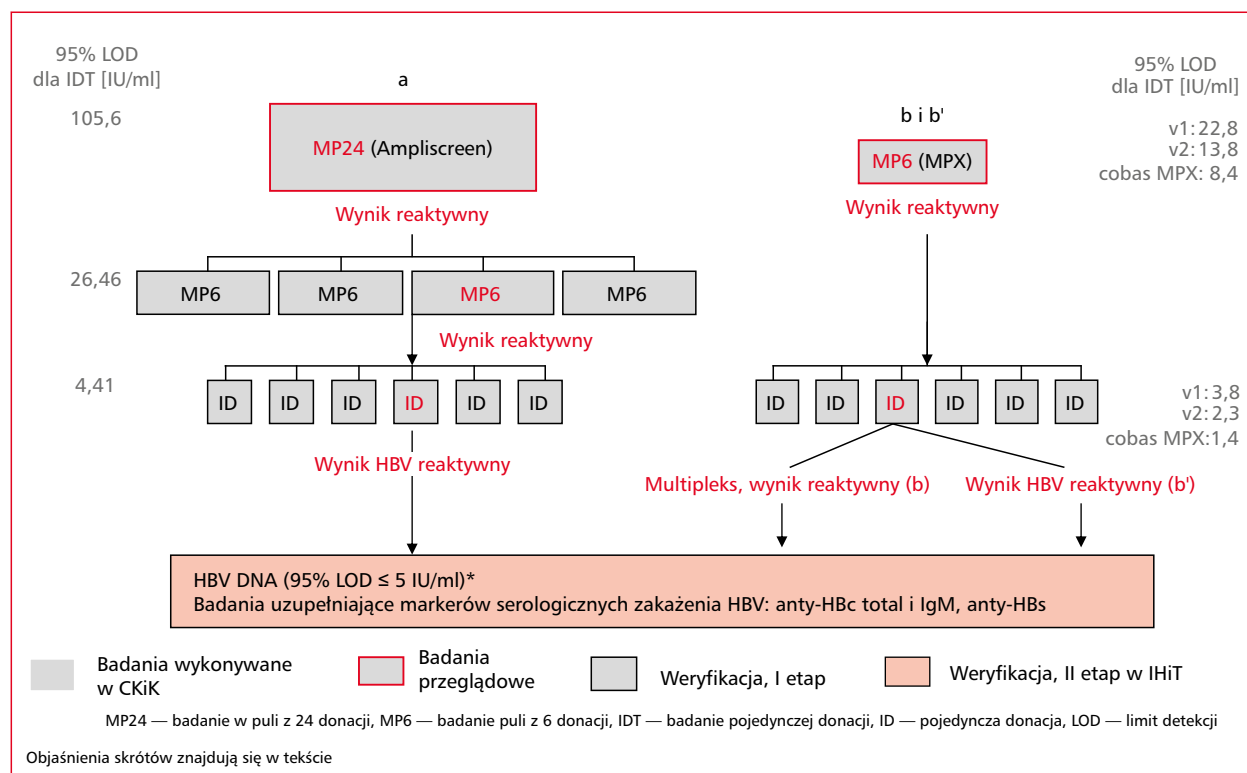
Test (badania przeglądowe, pośrednie, powtórkowe)	Czułość testu* — 95% LOD [IU/ml]	Format	Czułość dla donacji — 95% LOD [IU/ml]	Konieczność badań pośrednich lub powtórkowych/badań różnicujących (95% LOD [IU/ml])	Weryfikacja w IHIT donacji z wynikiem ID reaktywnym w teście:	Okres stosowania
Ampliscreen HBV#	4,4	MP24	105,6	4 subpule (MP6) i jeśli subpula (r), to ID/nie	HBV DNA	2005–2007
Taqscreen MPXv1	3,8	MP6	22,8	6 ID z MP6(r)/tak [4,41]	Multipleks	2007–2011 ^{&}
Taqscreen MPXv2	2,3	MP6	13,8	6 ID z MP6(r)/nie	HBV DNA	2012–2018
Cobas MPX	1,4	MP6	8,4	6 ID z MP6(r)/nie	HBV DNA	2019–2020
Ultrio (manualnie)	7,5	IDT	7,5	Nie/tak [8,5]	Ultrio	2005–2006
Ultrio (aparatur)	10,4	IDT	10,4	2 × Ultrio/tak [11]	2 Ultrio i/lub min. 1 Ultrio i dHBV	2007–2009
Ultrio Plus (aparatur)	2,1 ^{\$} (3,4 [^])	IDT	2,1 (3,4 [^])	2 × Ultrio/tak [2,5]	2 Ultrio i/lub min. 1 Ultrio i dHBV	2010–2013 ^{&}
Ultrio Elite	4,3	MP8	16,8 (27,2 [^])	IDT/tak [2,5]	HBV DNA	2012–2013
		IDT	4,3	2 Ultrio/tak [4,5]	2 Ultrio i/lub min. 1 Ultrio i dHBV	2014–2020
		MP4	17,2	ID/tak [4,5]	HBV DNA	2017–2020

Czułość na podstawie instrukcji testu; ^{\$}Procleix Ultrio na podstawie I wersji instrukcji testu; [^]Procleix Ultrio na podstawie III wersji instrukcji testu; (r) — wynik reaktywny; dHBV — badanie różnicujące w kierunku HBV DNA; [&]od 2011 roku rekomendacje krajowe: badanie powinno wykryć 24 IU HBV DNA/ml; ^{}test wykrywający tylko HBV DNA, w przeciwnym razie do pozostałych testów multipleks; objaśnienia skrótów znajdują się w tekście.

opartych na PCR, wynikał z wyższych czułości kolejnych wersji testu MPX. Czułość testów opartych na TMA zmieniała się w zakresie 2,1–10,4 IU/ml, a badań wykonywanych tą metodą w pulach — 16,8–17,2 IU/ml. Zmiany czułości badań wykorzystujących TMA były mniejsze niż badań wykorzystujących PCR, gdyż do roku 2011 badania tą metodą prowadzono tylko w pojedynczej donacji, a od 2011 roku spełniano wytyczne, aby stosowany format badania zapewniał wykrycie 24 IU HBV DNA obecnego w 1 ml donacji.

Przez cały okres 2005–2020 w niektórych CKiK (ryc. 4) używano testów wyprodukowanych przez Gen-Probe Incorporated (San Diego, USA), wykorzystujących metodę TMA (początkowo Test Procleix Ultrio Assay, a następnie jego kolejne wersje: Test Procleix Ultrio Plus Assay, Test Procleix Ultrio Elite Assay); w innych centrach stosowano tylko testy oparte na metodzie PCR (Ampliscreen HBV) oraz *real-time* PCR (PCR w czasie rzeczywistym) (Taqscreen MPX v.1, Taqscreen MPX v.2, cobas MPX) firmy Roche Molecular Systems (South Branchburg, USA). Część CKiK pracowało zamiennie na testach opartych na TMA i PCR.

W latach 2005–2006 badania przeglądowe HBV DNA u dawców prowadzono w pulach osocza otrzymywanych po połączeniu porcji próbek pobranych od 24 dawców lub w pojedynczych donacjach. Od roku 2007 badania w MP24 sukcesywnie zastępowano badaniem w pojedynczych donacjach (czułość badania 10,4 IU/ml — test Ultrio) lub w pulach tworzonych z 6 donacji. W przypadku zmiany wielkości pul z MP24 na MP6 i testów z Ampliscreen na Taqscreen MPXv1 nastąpiła zmiana czułości badania dla donacji z 105,6 IU/ml na 22,8 IU/ml. Od 2011 roku test Ultrio zastępowano wersją Ultrio Plus, charakteryzującą się wyższą czułością (95% LOD 2,1 IU/ml). W latach 2012–2014 próbki dawców z czterech CKiK badane były w puli z 8 donacji testem Ultrio Plus (czułość dla donacji 16,8 IU/ml). Od 2014 roku producent w materiałach informacyjnych testu Ultrio Plus zaczął podawać nieznacznie niższą czułość w porównaniu z wartością wskazywaną wcześniej (3,4 vs. 2,1 IU/ml). Od 2012 roku test Taqscreen MPXv1 zaczęto zastępować testem Taqscreen MPXv2, co spowodowało zwiększenie czułości badania pojedynczej donacji z 22,8 IU/ml do 13,8 IU/ml. Następnie, od 2018 roku, test Taqscreen MPXv2 zastępowano testem cobas MPX (zwiększenie czułości badania z 13,8 IU/ml do 8,4 IU/ml). Od roku 2014 test Ultrio Plus zastępowany był testem Ultrio Elite (czułość 4,3 IU/



Rycina 5. Postępowanie po otrzymaniu reaktywnego wyniku badania przeglądowego HBV DNA — PCR; *czułość według instrukcji testu

ml). Od 2017 roku pojedyncze CKiK prowadziły badania testem Ultrio Elite w pulach z 4 donacji (czułość 17,2 IU/ml). Zmiany czułości wykrywania HBV DNA w trakcie badań przeglądowych przedstawiono w tabeli 1 i na rycinie 4.

W przypadku uzyskania wyniku reaktywnego NAT dla donacji bez wykrytego HBsAg na terenie CKiK oraz w IHiT realizowano postępowanie, które miało na celu potwierdzenie lub wykluczenie zakażenia w próbce reaktywnej. Procedury te zostały opisane w dalszej części opracowania.

Postępowanie w CKiK i w IHiT po uzyskaniu wyniku reaktywnego badania przeglądowego HBV DNA dla donacji HBsAg-ujemnej

W przypadku uzyskania reaktywnego wyniku NAT (HBV DNA lub multipleks) zarówno dla puli, jak i dla pojedynczej donacji stosowano odpowiednie algorytmy w celu potwierdzenia tego wyniku. Każdy wynik reaktywny badania NAT uzyskany dla pojedynczej donacji w CKiK (I etap weryfikacji) był następnie weryfikowany w IHiT (II etap weryfikacji) w osoczu donacji przesyłanym z CKiK. Algorytm realizowany w CKiK ulegał zmianie w analizowanym okresie

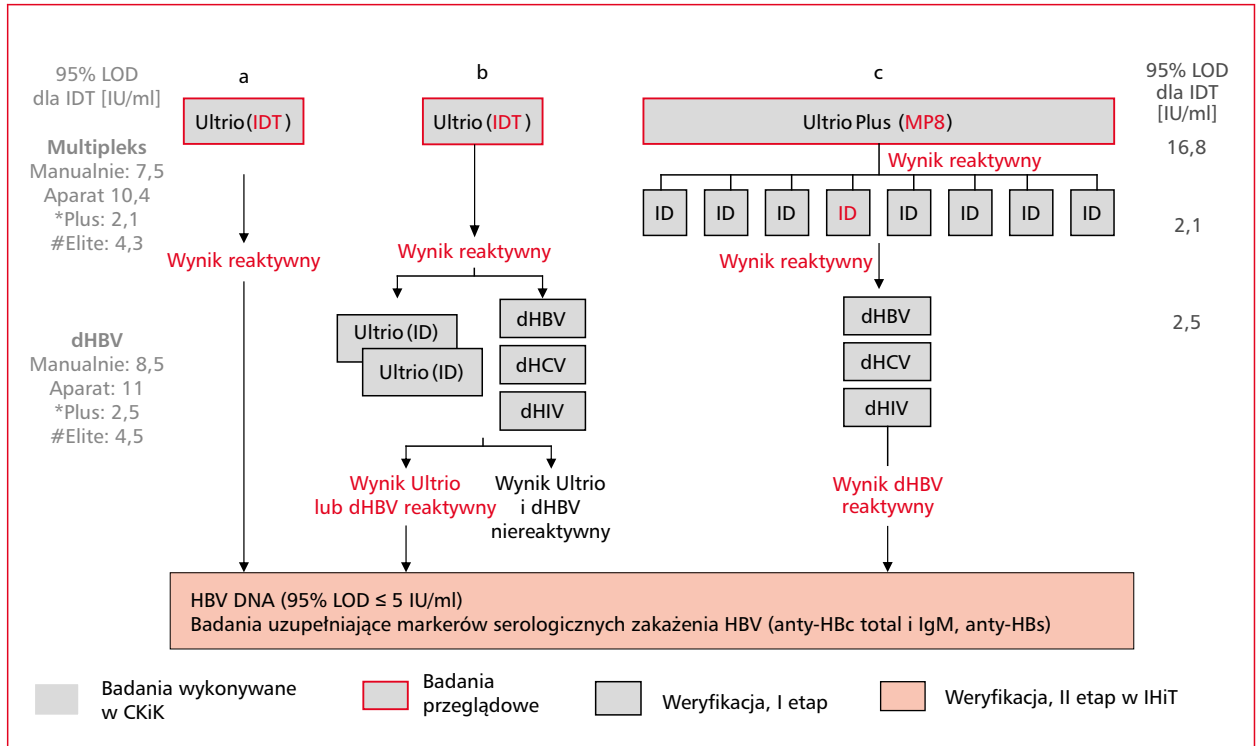
i był ściśle powiązany ze sposobem prowadzenia badania przeglądowego (ryc. 5, 6, tab. 1).

Weryfikacja I etap w RCKiK

W przypadku testów Ampliscreen HBV, którymi badano pule osocza złane od 24 dawców, należało w drodze badania tzw. subpuli (MP6), a następnie pojedynczych donacji zidentyfikować donację dawcy zakażonego HBV. Do IHiT przesyłano osocze donacji z wynikiem: HBV DNA reaktywny (a, ryc. 5).

Po uzyskaniu reaktywnego wyniku multipleks w badaniach opartych na PCR w puli złożonej z 6 donacji (MP6) w testach Taqscreen MPX, Taqscreen MPXv2 i cobas MPX należało zidentyfikować donację/donacje dodatnią/dodatnie wywołującą/wywołujące wynik reaktywny MP6 (b i b', ryc. 5). Wszystkie testy MPX były typu multipleks, ale tylko testy Taqscreen MPXv2 i cobas MPX wskazywały, który wirus został wykryty. Po badaniu sześciu ID testami Taqscreen MPXv2 i cobas MPX do IHiT przesyłano osocze donacji z wynikiem HBV DNA reaktywny (b', ryc. 5). Test Taqscreen MPXv1 nie identyfikował wykrytego wirusa, co wymagało wykonania w IHiT badania różnicującego dla przysyłanej z RCKiK próbki z wynikiem multiplex reaktywny (b, ryc. 5).

Z kolei po uzyskaniu reaktywnego wyniku multipleks w badaniach opartych na TMA:



Rycina 6. Postępowanie po otrzymaniu reaktywnego wyniku badania przeglądowego HBV DNA — TMA

- w teście Ultrio HCV/HBV/HIV wykonywanym w donacji pojedynczej w latach 2005–2007 należało przeprowadzić testy różnicujące HBV DNA, RNA HIV i RNA HCV, służące do identyfikacji wykrytego wirusa. Do identyfikacji HBV wykorzystywano test różnicujący dHBV. Do IHiT przesyłano osocze donacji z wynikiem Ultrio reaktywny, bez względu na to, czy wynik testu dHBV był reaktywny, czy też nie. Wyjątek stanowiły próbki, w których w testach różnicujących wykryto RNA HCV i/lub RNA HIV, a nie wykryto HBV — tych nie przesyłano do IHiT w celu weryfikacji HBV (a, ryc. 6). Takie postępowanie wiązało się z faktem, że test Ultrio był bardziej czuły niż test dHBV, a wirusie HBV mogą być bardzo niskie (poniżej czułości testu dHBV);
- w teście Ultrio HCV/HBV/HIV w latach 2008–2011 (od 2011 roku Ultrio Plus, od 2014 roku Ultrio Elite) w badaniach pojedynczej donacji należało wykonać z tej samej próbki 5 oznaczeń: 2 powtórzenia testu multipleks oraz 3 pojedyncze testy różnicujące w kierunku każdego z badanych wirusów: dHBV, dHCV, dHIV. Do IHiT przesyłano osocze donacji z wynikiem min. 2 Ultrio reaktywny i/lub min. 1 Ultrio i dHBV reaktywny (b, ryc. 6);
- w teście Ultrio Plus/Elite HCV/HBV/HIV wykonywanym w pulach z 8 i 4 donacji

należało przeprowadzić badanie indywidualne wszystkich donacji tworzących pulę reaktywną testem Ultrio Plus/Elite HCV/HBV/HIV, a następnie zbadać reaktywną donację testem różnicującym. Do IHiT przesyłano osocze donacji z wynikiem dHBV reaktywny (c, ryc. 6).

Weryfikacja II etap w IHiT

Badania weryfikacyjne (potwierdzające) zawsze prowadzono w IHiT w materiale biologicznym z nieotwieranej wcześniej próbki lub pojemnika z osoczem (tab. 1, ryc. 5, 6). Badaniami obejmowano donacje reaktywne zidentyfikowane w CKiK:

- a) w IDT w testach:
 - Ultrio (a, ryc. 6) niezależnie od wyniku badania różnicującego;
 - Ultrio Plus lub Elite, ale wyłącznie w przypadku uzyskania reaktywnego wyniku powtórnego badania testem multipleks (przeglądowym) i/lub testem różnicującym (b, ryc. 6);
- b) po rozpulowaniu badanych minipul testami:
 - Ampliscreen MP24 (a, ryc. 5);
 - Taqscreen MPXv1 (b, ryc. 5), Taqscreen MPXv2 oraz cobas MPX (b', ryc. 5) MP6;
 - Ultrio Plus MP8 (c, ryc. 6), Ultrio Elite MP4.

Badania weryfikacyjne zakażenia HBV w IHiT obejmowały badanie HBV DNA testami o czułości < 5 IU/ml (Ampliscreen HBV, Ultrio Plus, Ultrio

Elite, GFE Blut, Niemcy) oraz markerów serologicznych anty-HBc total, anty-HBc IgM i anty-HBs (Architect, Abbott Diagnostics, Niemcy). Stwierdzenie obecności poszczególnych markerów w donacji, dla której w CKiK otrzymano wynik reaktywny, pozwalało na określenie fazy zakażenia dawcy (I, II WP lub OBI) i zamieszczenie tych informacji na sprawozdaniu wyników badania. Wyniki badań były przekazywane dawcy łącznie ze skierowaniem do lekarza pierwszego kontaktu.

Stan obecny i perspektywy badań przeglądowych HBV u krwiodawców

W krwiodawstwie przeglądowe badania HBsAg prowadzone są od lat 70. XX wieku, a ich wykonywanie w 2016 roku raportowało do Światowej Organizacji Zdrowia 44/46 krajów w Europie i 176/180 krajów na świecie [1].

Od 1999 roku w kolejnych częściach świata do panelu rutynowych badań dołączane jest badanie HBV DNA [1, 49]. W 2016 roku było ono wykonywane w krajach: Europy (n = 22), Ameryki Północnej i Południowej (n = 4), Afryki (n = 2), Bliskiego Wschodu (n = 5), Zachodniego Pacyfiku (n = 7) oraz południowo-wschodniej Azji (n = 2). Podobnie jak w Polsce, o czym była mowa wcześniej, przeglądowe badania molekularne opierają się na metodzie TMA lub PCR i wykonywane są w pojedynczych donacjach lub minipulach powstałych przez zlanie osocza z określonej liczby próbek [49]. Od 2017 roku Komisja Europejska zaleca, aby w przypadku stosowania przeglądowych badań NAT, niezależnie od przyjętych strategii, ich czułość umożliwiała wykrycie w donacji przynajmniej 100 IU HBV DNA/ml [7]. W poszczególnych krajach strategię badań: IDT i wielkość minipul (MP4–MP96) są wybierane po analizach epidemiologicznych, ekonomicznych itp. i podawane w wewnętrznych regulacjach dla krwiodawstwa [50, 51].

W krajach w przeszłości borykających się z epidemią HBV, w których wprowadzono obowiązkowe szczepienia noworodków przeciw WZW B, obserwuje się regularne spadki częstości wykrywania zakażeń HBsAg-dodatnich, czego nie odnotowano dla zakażeń ukrytych [52–55]. Analizy przeglądowych badań HBV DNA wskazały, że ich coraz wyższa czułość zwiększa możliwość wykrywania OBI i w okresie WP [53, 56, 57]. Z kolei badanie anty-HBc pozwala wykryć zarówno zakażenia HBsAg-dodatnie, jak i anty-HBc-dodatnie OBI. Ze względu na bardzo niskie wiremie i zmiany ich poziomu w czasie zakażenia ukrytego nie zawsze są wykrywalne

w badaniu HBV DNA [9, 58]. W odniesieniu do tych obserwacji trwają dyskusje nad optymalnym doбором panelu badań przeglądowych w krwiodawstwie. W Stanach Zjednoczonych stwierdzono wyższą efektywność równoległych badań: HBV DNA w pulach z 16 donacji (czułość dla ID 68,8 IU/ml) i anty-HBc niż HBV DNA MP16 i HBsAg [9]. Z kolei w RPA wykazano, że samo badanie ID-NAT osiąga wyższą skuteczność w ograniczaniu ryzyka przeniesienia wirusa HBV niż MP(6–16)-NAT łącznie z testami HBsAg i anty-HBc wykonywanymi w każdej indywidualnej donacji, a zwłaszcza w donacjach dawców wielokrotnych; porównywalną skuteczność stwierdzono w donacjach dawców pierwszorazowych. Ponadto przedstawione w 2019 roku podczas konferencji Międzynarodowego Stowarzyszenia ds. Osocza i Frakcjonowania (IPFA, *International Plasma and Fractionation Association*) analizy z RPA wskazują, że skuteczność strategii badań przeglądowych zależy głównie od czułości testu, a wpływ epidemiologii regionu i zapadalności jest marginalny (wykład dostępny na stronie IPFA dla uczestników konferencji). Przytoczone prace sugerują jako właściwe różne strategie badań, co wskazuje, że niezbędne jest wykonanie indywidualnej analizy dla Polski.

W naszym kraju, w celu określenia optymalnego panelu badań HBV u krwiodawców, konieczne jest przeprowadzenie analizy częstości wykrywania HBsAg i HBV DNA przy użyciu dotychczas stosowanych strategii z wyliczeniem pozostającego ryzyka TT-HBV oraz jego oszacowaniem dla dostępnych strategii, w tym z uwzględnieniem badań anty-HBc. Będzie to przedmiotem kolejnej pracy.

Podziękowanie

Autorzy dziękują mgr Dorocie Kubickiej-Russel za pomoc w opracowaniu danych wykorzystanych w niniejszej pracy.

Piśmiennictwo

1. Global Hepatitis Report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017.
2. Kleinman SH, Lelie N, Busch MP. Infectivity of human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus and risk of transmission by transfusion. *Transfusion*. 2009; 49(11): 2454–2489, doi: [10.1111/j.1537-2995.2009.02322.x](https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02322.x), indexed in Pubmed: 19682345.
3. Liang T. Hepatitis B: The virus and disease. *Hepatology*. 2009; 49(S5): S13–S21, doi: [10.1002/hep.22881](https://doi.org/10.1002/hep.22881), indexed in Pubmed: 19399811.
4. Liaw YF, Chu CM. Hepatitis B virus infection. *The Lancet*. 2009; 373(9663): 582–592, doi: [10.1016/s0140-6736\(09\)60207-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(09)60207-5).
5. Allain J-P. Global epidemiology of occult HBV infection. *Home*. 2017; 2(5), doi: [10.21037/aob.2017.06.01](https://doi.org/10.21037/aob.2017.06.01).

6. DIRECTIVE 2002/98/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 27 January 2003 setting standards of quality and safety for the collection, testing, processing, storage and distribution of human blood and blood components and amending Directive. 2001/83/EC.
7. Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components, 19th Edition 2017. <https://www.edqm.eu/en/blood-transfusion-guide>.
8. Janssen M.P. The collection, testing and use of blood and blood components in Europe 2015 report. <https://www.edqm.eu/en/blood-transfusion-reports-70.html2015>.
9. Dodd RY, Nguyen ML, Krysztof DE, et al. Blood donor testing for hepatitis B virus in the United States: is there a case for continuation of hepatitis B surface antigen detection? *Transfusion*. 2018; 58(9): 2166–2170, doi: [10.1111/trf.14784](https://doi.org/10.1111/trf.14784), indexed in Pubmed: [30144082](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30144082/).
10. Seed C, Allain J, Lozano M, et al. International Forum on Occult hepatitis B infection and transfusion safety. *Vox Sanguinis*. 2019; 114(4): e1–e35, doi: [10.1111/vox.12743](https://doi.org/10.1111/vox.12743).
11. Tsai KN, Kuo CF, Ou JHJ. Mechanisms of Hepatitis B Virus Persistence. *Trends Microbiol*. 2018; 26(1): 33–42, doi: [10.1016/j.tim.2017.07.006](https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.07.006), indexed in Pubmed: [28823759](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28823759/).
12. Hong M, Bertoletti A. Tolerance and immunity to pathogens in early life: insights from HBV infection. *Semin Immunopathol*. 2017; 39(6): 643–652, doi: [10.1007/s00281-017-0641-1](https://doi.org/10.1007/s00281-017-0641-1), indexed in Pubmed: [28685270](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28685270/).
13. Yoshikawa A, Gotanda Y, Itabashi M, et al. Japanese Red Cross NAT Screening Research Group. HBV NAT positive [corrected] blood donors in the early and late stages of HBV infection: analyses of the window period and kinetics of HBV DNA. *Vox Sang*. 2005; 88(2): 77–86, doi: [10.1111/j.1423-0410.2005.00602.x](https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2005.00602.x), indexed in Pubmed: [15720604](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15720604/).
14. Vermeulen M, Dickens C, Lelie N, et al. Hepatitis B virus transmission by blood transfusion during 4 years of individual-donation nucleic acid testing in South Africa: estimated and observed window period risk. *Transfusion*. 2012; 52(4): 880–892, doi: [10.1111/j.1537-2995.2011.03355.x](https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03355.x), indexed in Pubmed: [21981386](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21981386/).
15. Trépo C, Chan H, Lok A. Hepatitis B virus infection. *The Lancet*. 2014; 384(9959): 2053–2063, doi: [10.1016/s0140-6736\(14\)60220-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(14)60220-8).
16. Juszczyk J. Clinical course and consequences of hepatitis B infection. *Vaccine*. 2000; 18 Suppl 1: S23–S25, doi: [10.1016/s0264-410x\(99\)00457-0](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(99)00457-0), indexed in Pubmed: [10683539](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10683539/).
17. Tu T, Budzinska MA, Shackel NA, et al. HBV DNA Integration: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Viruses*. 2017; 9(4), doi: [10.3390/v9040075](https://doi.org/10.3390/v9040075), indexed in Pubmed: [28394272](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28394272/).
18. Hu B, Wang R, Fu J, et al. Integration of hepatitis B virus S gene impacts on hepatitis B surface antigen levels in patients with antiviral therapy. *J Gastroenterol Hepatol*. 2018; 33(7): 1389–1396, doi: [10.1111/jgh.14075](https://doi.org/10.1111/jgh.14075), indexed in Pubmed: [29266382](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29266382/).
19. Raimondo G, Caccamo G, Filomia R, et al. Occult HBV infection. *Semin Immunopathol*. 2013; 35(1): 39–52, doi: [10.1007/s00281-012-0327-7](https://doi.org/10.1007/s00281-012-0327-7), indexed in Pubmed: [22829332](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22829332/).
20. Lampertico P, Agarwal K, Berg T, et al. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 2017; 67(2): 370–398, doi: [10.1016/j.jhep.2017.03.021](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.03.021).
21. Seto WK, Lo YR, Pawlotsky JM, et al. Chronic hepatitis B virus infection. *The Lancet*. 2018; 392(10161): 2313–2324, doi: [10.1016/s0140-6736\(18\)31865-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)31865-8).
22. Korelitz JJ, Busch MP, Kleinman SH, et al. A method for estimating hepatitis B virus incidence rates in volunteer blood donors. National Heart, Lung, and Blood Institute Retrovirus Epidemiology Donor Study. *Transfusion*. 1997; 37(6): 634–640, doi: [10.1046/j.1537-2995.1997.37697335159.x](https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1997.37697335159.x), indexed in Pubmed: [9191825](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9191825/).
23. Scheiblaue H, El-Nageh M, Diaz S, et al. Performance evaluation of 70 hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) assays from around the world by a geographically diverse panel with an array of HBV genotypes and HBsAg subtypes. *Vox Sang*. 2010; 98(3 Pt 2): 403–414, doi: [10.1111/j.1423-0410.2009.01272.x](https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2009.01272.x), indexed in Pubmed: [20412171](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20412171/).
24. Shinkai N, Kusumoto S, Murakami S, et al. Novel monitoring of hepatitis B reactivation based on ultra-high sensitive hepatitis B surface antigen assay. *Liver Int*. 2017; 37(8): 1138–1147, doi: [10.1111/liv.13349](https://doi.org/10.1111/liv.13349), indexed in Pubmed: [27992664](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27992664/).
25. Deguchi M, Kagita M, Yoshioka N, et al. Evaluation of the highly sensitive chemiluminescent enzyme immunoassay “Lumipulse HBsAg-HQ” for hepatitis B virus screening. *J Clin Lab Anal*. 2018; 32(4): e22334, doi: [10.1002/jcla.22334](https://doi.org/10.1002/jcla.22334), indexed in Pubmed: [28984383](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28984383/).
26. Pondé RAA. Atypical serological profiles in hepatitis B virus infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013; 32(4): 461–476, doi: [10.1007/s10096-012-1781-9](https://doi.org/10.1007/s10096-012-1781-9), indexed in Pubmed: [23192489](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23192489/).
27. Hsu HY, Chang MH, Ni YH, et al. Chronologic changes in serum hepatitis B virus DNA, genotypes, surface antigen mutants and reverse transcriptase mutants during 25-year nationwide immunization in Taiwan. *J Viral Hepat*. 2017; 24(8): 645–653, doi: [10.1111/jvh.12687](https://doi.org/10.1111/jvh.12687), indexed in Pubmed: [28182307](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28182307/).
28. Candotti D, Laperche S. Hepatitis B Virus Blood Screening: Need for Reappraisal of Blood Safety Measures? *Front Med (Lausanne)*. 2018; 5: 29, doi: [10.3389/fmed.2018.00029](https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00029), indexed in Pubmed: [29515997](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29515997/).
29. Vermeulen M, van Drimmelen H, Coleman C, et al. A mathematical approach to estimate the efficacy of individual-donation and minipool nucleic acid amplification test options in preventing transmission risk by window period and occult hepatitis B virus infections. *Transfusion*. 2014; 54(10): 2496–2504, doi: [10.1111/trf.12657](https://doi.org/10.1111/trf.12657), indexed in Pubmed: [24749834](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24749834/).
30. Zhang ZH, Wu CC, Chen XW, et al. Genetic variation of hepatitis B virus and its significance for pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2016; 22(1): 126–144, doi: [10.3748/wjg.v22.i1.126](https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i1.126), indexed in Pubmed: [26755865](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26755865/).
31. Brojer E, Grabarczyk P, Liszewski G, et al. Polish Blood Transfusion Service Viral Study Group. Characterization of HBV DNA +/- HBsAg- blood donors in Poland identified by triplex NAT. *Hepatology*. 2006; 44(6): 1666–1674, doi: [10.1002/hep.21413](https://doi.org/10.1002/hep.21413), indexed in Pubmed: [17133474](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17133474/).
32. Candotti D, Grabarczyk P, Ghiazza P, et al. Characterization of occult hepatitis B virus from blood donors carrying genotype A2 or genotype D strains. *J Hepatol*. 2008; 49(4): 537–547, doi: [10.1016/j.jhep.2008.04.017](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.04.017), indexed in Pubmed: [18602718](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18602718/).
33. Grabarczyk P, Garmiri P, Liszewski G, et al. Polish Blood Transfusion Centres Viral Study Group. Molecular and serological characterization of hepatitis B virus genotype A and D infected blood donors in Poland. *J Viral Hepat*. 2010; 17(6): 444–452, doi: [10.1111/j.1365-2893.2009.01192.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2009.01192.x), indexed in Pubmed: [19780948](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19780948/).
34. Lelie N, Bruhn R, Busch M, et al. International NAT Study Group. Detection of different categories of hepatitis B virus (HBV) infection in a multi-regional study comparing the clinical

- sensitivity of hepatitis B surface antigen and HBV-DNA testing. *Transfusion*. 2017; 57(1): 24–35, doi: [10.1111/trf.13819](https://doi.org/10.1111/trf.13819), indexed in Pubmed: [27673757](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27673757/).
35. Gerlich WH. Prophylactic vaccination against hepatitis B: achievements, challenges and perspectives. *Med Microbiol Immunol*. 2015; 204(1): 39–55, doi: [10.1007/s00430-014-0373-y](https://doi.org/10.1007/s00430-014-0373-y), indexed in Pubmed: [25523195](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25523195/).
 36. Kleinman SH, Busch MP. Assessing the impact of HBV NAT on window period reduction and residual risk. *J Clin Virol*. 2006; 36 Suppl 1: S23–S29, doi: [10.1016/s1386-6532\(06\)80005-3](https://doi.org/10.1016/s1386-6532(06)80005-3), indexed in Pubmed: [16831689](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16831689/).
 37. Weusten J, Vermeulen M, van Drimmelen H, et al. Refinement of a viral transmission risk model for blood donations in seroconversion window phase screened by nucleic acid testing in different pool sizes and repeat test algorithms. *Transfusion*. 2011; 51(1): 203–215, doi: [10.1111/j.1537-2995.2010.02804.x](https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2010.02804.x), indexed in Pubmed: [20707858](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20707858/).
 38. Coppola N, Sagnelli C, Pisaturo M, et al. Clinical and virological characteristics associated with severe acute hepatitis B. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20(12): O991–O997, doi: [10.1111/1469-0691.12720](https://doi.org/10.1111/1469-0691.12720), indexed in Pubmed: [24930916](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24930916/).
 39. Ciupe SM. Modeling the dynamics of hepatitis B infection, immunity, and drug therapy. *Immunol Rev*. 2018; 285(1): 38–54, doi: [10.1111/immr.12686](https://doi.org/10.1111/immr.12686), indexed in Pubmed: [30129194](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30129194/).
 40. Raimondo G, Allain JP, Brunetto MR, et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 2008; 49(4): 652–657, doi: [10.1016/j.jhep.2008.07.014](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.07.014), indexed in Pubmed: [18715666](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18715666/).
 41. Raimondo G, Locarnini S, Pollicino T, et al. Update of the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 2019; 71(2): 397–408, doi: [10.1016/j.jhep.2019.03.034](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.03.034).
 42. Levicnik-Stežinar S, Rahne-Potokar U, Candotti D, et al. Anti-HBs positive occult hepatitis B virus carrier blood infectious in two transfusion recipients. *J Hepatol*. 2008; 48(6): 1022–1025, doi: [10.1016/j.jhep.2008.02.016](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.02.016), indexed in Pubmed: [18436328](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18436328/).
 43. Zheng X, Ye X, Zhang L, et al. Characterization of occult hepatitis B virus infection from blood donors in China. *J Clin Microbiol*. 2011; 49(5): 1730–1737, doi: [10.1128/JCM.00145-11](https://doi.org/10.1128/JCM.00145-11), indexed in Pubmed: [21411575](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21411575/).
 44. Guo Z, Fu P, Yin Y, et al. The characteristics of hepatitis B surface antigen (HBsAg)-negative hepatitis B virus (HBV) infection in Chinese blood donors: a follow-up study of donors tested negative for HBsAg and reactive for simultaneous nucleic acid testing of HBV, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus. *Transfusion*. 2017; 57(3pt2): 832–840, doi: [10.1111/trf.14014](https://doi.org/10.1111/trf.14014), indexed in Pubmed: [28164313](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28164313/).
 45. Obwieszczanie Ministra Zdrowia z dnia 9 czerwca 2017 r. w sprawie wymagań dobrej praktyki pobierania krwi i jej składników, badania, preparatyki, przechowywania, wydawania i transportu dla jednostek organizacyjnych publicznej służby krwi. Ustawa z dnia 22 sierpnia 1997 r. o publicznej służbie krwi (Dz. U. Nr 106, poz. 681 z późn. zmian).
 46. Łętowska M. (red.). *Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi*. Instytut Hematologii i Transfuzjologii; Warszawa 2006 (wersja 4; 2010).
 47. Łętowska M. (red.). *Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi*. Instytut Hematologii i Transfuzjologii; wydanie II; 2011.
 48. Łętowska M. (red.). *Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi*. Instytut Hematologii i Transfuzjologii; wydanie III, 2014.
 49. Roth WKea. International survey on NAT testing of blood donations: expanding implementation and yield from 1999 to 2009. *Vox Sanguinis*; 2012; 82–90.
 50. Stramer SL, Notari EP, Krysztof DE, et al. Hepatitis B virus testing by minipool nucleic acid testing: does it improve blood safety? *Transfusion*. 2013; 53(10 Pt 2): 2449–2458, doi: [10.1111/trf.12213](https://doi.org/10.1111/trf.12213), indexed in Pubmed: [23607261](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23607261/).
 51. Stolz M, Tinguely C, Fontana S, et al. Hepatitis B virus DNA viral load determination in hepatitis B surface antigen-negative Swiss blood donors. *Transfusion*. 2014; 54(11): 2961–2967, doi: [10.1111/trf.12694](https://doi.org/10.1111/trf.12694), indexed in Pubmed: [24805974](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24805974/).
 52. Kopacz A, Gdowska J, Gorska J, et al. Sensitivity of the Ultrio and Ultrio Plus Assay versions in detecting window period and occult hepatitis B infection in Polish blood donors. *Vox Sanguinis*. 2013; 105: 178–178.
 53. Tsoi WC, Lelie N, Lin CK. Enhanced detection of hepatitis B virus in Hong Kong blood donors after introduction of a more sensitive transcription-mediated amplification assay. *Transfusion*. 2013; 53(10 Pt 2): 2477–2488, doi: [10.1111/trf.12165](https://doi.org/10.1111/trf.12165), indexed in Pubmed: [23521050](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23521050/).
 54. Grabarczyk P, Kopacz A, Sulkowska E, et al. Blood donors screening for blood born viruses in Poland. *Przegl. Epidemiol*. 2015; 69(3): 473–7, 591, indexed in Pubmed: [26519842](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26519842/).
 55. Ramachandran S, Groves J, Xia G, et al. Recent and occult hepatitis B virus infections among blood donors in the United States. *Transfusion*. 2018; 59(2): 601–611, doi: [10.1111/trf.15057](https://doi.org/10.1111/trf.15057).
 56. Vermeulen M, Coleman C, Lelie N, et al. Enhancement of HBV NAT yield rate after introduction of the Ultrio Plus Assay. *Vox Sanguinis*. 2012; 103: 161–161.
 57. Grabarczyk P, van Drimmelen H, Kopacz A, et al. Head-to-head comparison of two transcription-mediated amplification assay versions for detection of hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus Type 1 in blood donors. *Transfusion*. 2013; 53(10 Pt 2): 2512–2524, doi: [10.1111/trf.12190](https://doi.org/10.1111/trf.12190), indexed in Pubmed: [23590145](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23590145/).
 58. Stramer SL, Zou S, Notari EP, et al. Blood donation screening for hepatitis B virus markers in the era of nucleic acid testing: are all tests of value? *Transfusion*. 2012; 52(2): 440–446, doi: [10.1111/j.1537-2995.2011.03283.x](https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03283.x), indexed in Pubmed: [21810101](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21810101/).