

Važnost detekcije protutijela na sržni antigen u identifikaciji dobrovoljnih davatelja krvi s okultnom infekcijom virusom hepatitisa B

Miletić, Manuela

Doctoral thesis / Disertacija

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:610542>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO - BIOKEMIJSKI FAKULTET

Manuela Miletić

**VAŽNOST DETEKCIJE PROTUTIJELA
NA SRŽNI ANTIGEN U
IDENTIFIKACIJI DOBROVOLJNIH
DAVATELJA KRVI S OKULTNOM
INFEKCIJOM VIRUSOM HEPATITISA
B**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2019.



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Manuela Miletić

**VAŽNOST DETEKCIJE PROTUTIJELA
NA SRŽNI ANTIGEN U
IDENTIFIKACIJI DOBROVOLJNIH
DAVATELJA KRVI S OKULTNOM
INFEKCIJOM VIRUSOM HEPATITISA
B**

DOKTORSKI RAD

Mentor: Prof. dr. sc. Karmela Barišić

Zagreb, 2019



Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Manuela Miletić

**THE SIGNIFICANCE OF Anti-HBc
DETECTION IN IDENTIFICATION OF
VOLUNTEER BLOOD DONORS WITH
OCCULT HEPATITIS B VIRUS
INFECTION IN CROATIA**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Prof. Karmela Barišić, PhD

Zagreb, 2019

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti u području biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Rad je izrađen u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, i to u Odjelu za dijagnostiku krvlju prenosivih bolesti, Odjelu za testiranje davatelja krvi i Odjelu za molekularnu dijagnostiku.

Moj doktorski rad posvećujem svom pokojnom ocu

Antunu Miletiću,

vječnom ličkom sokolu,

za svu dobrotu, mirnoću, ljubav i mudrost koju mi je dao!

I dalje čujem njegov hod i vidim duboke jasne plave oči,

Vidim češkanje po glavi, dok je razmišljao, i ruke tople, zaštitničke,

I pamtim nastojanje da bude uvijek dobra vila svima!

Nikada drugog umanjio, da bi sebe uzdigao!

*Uz tatu ide i mama, **Katarina Miletić,***

I majčinska ljubav, koju samo svaka mama zna,

Sretan je onaj tko mamu ima!

Mojoj Ivanki, dr. sc. **Ivanki Mihaljević**, neizmjereno hvala baš za sve! Bila je i jest, prijateljica, kolegica, učiteljica, druga mama, i rame za veselje i plakanje, podrška i stijena.

Nije mi dala da odustanem! Baš kao cccDNA je u mom srcu!

Mom laboratorijskom **TIMU A1!** – **Slobodanu Staniću, Vjekoslavu Tančaku, Sanji Pustišek, Štefici Turkalj, Romani Klančir, Katici Račić i Dušanu Đuraškoviću** hvala na profesionalnosti iz dana u dan, na bezrezervnoj pomoći i entuzijazmu za sve moje ideje! Oni koji u život drugih unesu svjetlost, ne mogu je sakriti od sebe! Vi ste naša mRNA!

Kolegama, prim. dr. sc. **Tomislavu Vuku**, dr. sc. **Jasni Bingulac-Popović**, dr. sc. **Ani Hećimović** („Ana, koliki je P; nema mediana, ima li korelacije...“), dr. **Miljani Stojić Vidović** i spec. **Ivani Babić**, hvala na zajedničkom radu, rezultatima, podršci i energiji u izradi ovog istraživanja! Vi ste kao DNA-polimeraza!

Laboratorijskom timu A2! – **Manueli Pavlica, Ruži Medved, Salihu Bajriću i Ivani Žokvić** hvala za srdačnost i dobru energiju!

Prof. dr. sc. **Karmeli Barišić**, koja je pristala na circulus vitiosus, za sugestije, mišljenja i brigu hvala od srca!

Mojoj djeci, **Antoniu i Danielu Lovriću**, koji su de facto u svakoj mojoj stanici, hvala za svo veselje i sreću i ljubav, jer o vama stalno razmišljam i zbog vas nisam odustala kada je bilo najteže! Pomogli ste mi da zadržim Božju riječ u srcu! Vi ste moj HBcAg!

Mom bratu, **Davoru Miletiću**, moralnoj vertikali u mom životu, hvala što postoji! Život bi bio prazan bez tebe!

Mojim nećacima **Dominiku, Gabrielu i Luciji Miletić**, hvala za novu dimenziju života, za dokaz da u sebi imamo neizmjereno ljubavi, i stalno iz početka!

Mojim prijateljicama, dr. **Mirki Berendika, Diani Hodak**, dr. **Mariji Ruševljan**, dr. **Milici Liker, Lidiji Grgić**, mag. **Darki Stošić**, dr. **Martini Radmanović**, hvala za riječi: Možeš ti to!

Dragom **Goranu Božičeviću** hvala jer mi dokazuje da život prolazi uludo ako se ljubav ne daje!

„...i onda kad ne bude nas bilo, pivat će se pisme naše...“

SAŽETAK

Okultna infekcija virusom hepatitisa B (OBI) u davatelja krvi najčešći je uzrok prijenosa virusa hepatitisa B (HBV) transfuzijama krvnih pripravaka. OBI se definira kao prisutnost virusne DNA bez prisustva HBsAg-a u krvi izvan tzv. *window* perioda (WP) infekcije. Kod OBI-ja nisu nužno prisutna specifična protutijela na virusne antigene, međutim ako jesu (seropozitivni OBI), najčešće su prisutna protutijela na sržni antigen HBV-a, anti-HBc. Obzirom na negativan rezultat HBsAg-a i intermitentnu viremiju, prisutna anti-HBc jedini su biljeg koji može upućivati na OBI.

Kako testiranje krvi dobrovoljnih davatelja (DDK) u Republici Hrvatskoj ne uključuje testiranje na anti-HBc, glavni cilj i svrha ovog istraživanja bio je odrediti prevalenciju anti-HBc-a u populaciji DDK-a Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu (HZTM), ukupnu te prema dobi, spolu i broju davanja krvi, utvrditi važnost određivanja anti-HBc-a u detekciji OBI-ja, prevalenciju OBI-ja u populaciji DDK-a i procijeniti rizik od prijenosa HBV-a transfuzijama krvi uključujući DDK-e s OBI-jem. U tu svrhu analizirana je prisutnost anti-HBc-a i protutijela na druge antigene HBV-a te virusne DNA u arhivskim uzorcima DDK-a HZTM-a iz 2004. (7561 uzoraka) i iz 2013. godine (7318 uzoraka) te prospektivno u 2017. godini 5090 uzoraka krvi.

Zabilježen je značajan pad prevalencije anti-HBc-a u populaciji DDK-a HZTM-a, i to 4 puta, s 5,24 % na 1,32 %, što je uglavnom posljedica pada prevalencije u višestrukih davatelja krvi s 5,90 % na 1,38 %. Serološki HBV profili anti-HBc pozitivnih DDK-a nisu se značajno promijenili u ispitivanom razdoblju, udjeli anti-HBs, anti-HBe i anti-HBc-*only* pozitivnih DDK-a bili su podjednaki u sve tri godine istraživanja. Srednja izračunata avidnost anti-HBc IgG-a je 0,92 što upućuje na davni kontakt s HBV-om. Prevalencija anti-HBc-a u populaciji DDK-a HZTM-a od 1:19 u 2013. i 1:76 u 2017. godini, značajno je viša od prevalencije DDK-a s OBI-jem, koja je 2013. bila 1:11.213, a 2017. godine 1:30.932. Ostatni rizik za 2004. godinu iznosi 1:14.925; za 2013. godinu 1:11.363; za 2017. godinu 1:83.333. Ostatni rizik ima silazni trend. Eliminacijom svih anti-HBc pozitivnih trebalo bi nadoknaditi minimalno 1,32 % DDK-a.

Rad predstavlja originalni znanstveni doprinos u potvrdi važnosti anti-HBc testa u otkrivanju DDK-a s mogućim OBI-jem, u slučajevima intermitentne HBV DNA viremije, te u odabiru strategije ispitivanja DDK na anti-HBc, uz postojeći panel HBsAg i ID-NAT (od *engl.*

Individual Donor-Nucleic Acid Testing) u Republici Hrvatskoj, što bi bila dodatna mjera u sprječavanju prijenosa HBV-a krvlju i krvnim pripravcima.

Ključne riječi: dobrovoljni davatelji krvi (DDK), prevalencija anti-HBc-a, okultna infekcija virusom hepatitisa B (OBI).

SUMMARY

1. Introduction

The risk of transfusion-transmitted hepatitis B virus (HBV) infection is very low but remains higher than the transmission risk associated with other viruses for which mandatory testing is also in place (Candotti i Allain 2009). This difference in transfusion-transmission risk may be related to the variability of the clinical presentation of HBV infection and the associated host's immune responses, the viral replication and serological markers dynamics that makes both the selection of blood donors and testing more difficult. Which tests are to be used for blood donor (BD) screening will depend on the HBV prevalence in the general and BD populations, the ratio of first-time (FTD) and repeat donors (RD), self-sufficiency in blood supply, and the country's economic resources.

According to the WHO report (WHO 2017), several methods for HBV BD testing are available: a) HBsAg testing is the most common strategy globally, used by 56 % (98/176) of WHO member states (Europe: 32.5 % or 14/43); b) HBsAg and anti-HBc testing is used by 17.6 % (31/176) of countries worldwide (Europe: 9.3 % or 4/43) including 5 countries (3 of which are EU member states) that implemented selective anti-HBc tests; c) HBV DNA and HBsAg testing is used by 11.9 % (21/176) of countries (Europe: 27 % or 12/43); and d) HBV DNA, HBsAg and anti-HBc testing is used in 7.4 % (12/176) of countries including 11.6 % (5/43) of European countries. Additional 8 countries (including 5 EU member states) implemented the 3-test strategy with selective anti-HBc testing.

The implementation of molecular testing allowed the detection of occult hepatitis B virus infection (OBI) also characterized by the presence of detectable anti-HBc (Raimonndo et al. 2008; Lee 1997). Anti-HBc testing proved to be more efficient than NAT (Nucleic Acid Testing) when HBV DNA load corresponds to the lower limit of sensitivity of the NAT assay (<3 IU/mL HBV DNA). However, in the absence of molecular testing, qualitative anti-HBc testing does not discriminate between potentially infectious and non-infectious samples (Allain 2004; Stramer et al. 2012; Lelie et al. 2017; O'Brien et al. 2007). Anti-HBc was used recently as a supplementary test in the HBV DNA ID-NAT confirmation algorithm for initially reactive (IR) and non-repeated reactive (NRR) blood donors with HBV DNA load usually below 10 IU/mL and not confirmed by using quantitative highly sensitive tests or discriminatory ID-NAT tests.

Croatian Institute of Transfusion Medicine (CITM) is a national reference centre for transfusion medicine which collects more than 50 % of all blood donations in Croatia every year (approx. 100,000 donations). The need to change BD HBV testing strategy in Croatia by introducing anti-HBc was assessed first in 2005 by using archive samples of BD collected in 2004. This study aimed to establish the frequency of anti-HBc-only positive donors and their infectivity as HBV DNA testing was limited to this group of donors (Mihaljević et al. 2007). Two other studies investigating the efficiency of the anti-HBc marker in BD testing were carried out in 2013 and 2017. The objectives of the present study were to document anti-HBc prevalence in Croatian BDs (in CITM) over a 14-years period, analyse trends in anti-HBc prevalence according to age and gender and according to number of donations, to evaluate the potential infectivity of anti-HBc positive BDs by testing for HBV DNA presence. Data collected will provide elements to evaluate the impact of a possible introduction of anti-HBc testing of blood donors on HBV residual risk and potential loss of blood donors.

2. Material and methods

2.1. Blood samples

Archived residual serum samples from blood donations collected in October 2004 and in July-August 2013 and prospectively collected residual samples in May 2017 by CITM were included in the study. Samples were collected from consecutive donations and therefore were not stratified according to gender, age and the number of donations. BDs were classified in the following age groups: < 20, 20-24, 25-29, 30-34, 35-39, 40-44, 45-49, 50-54, 55-59 and ≥ 60 . Basic characteristics of the tested BD population in the 2004, 2013 and 2017 studies of the CITM are shown in Table 1. Serum samples were prepared for testing according to the standard operating procedures, and testing was done according to the manufacturer's instructions. The study was performed with the consent of the competent Ethical Committee pursuant to the Declaration of Helsinki.

2.2. Serological and molecular screening

Table 2 shows assays used for serological markers and HBV DNA testing according to the manufacturers' instructions.

Table 1
Blood donor characteristics in the three studies and residual risk calculation.

Characteristics of blood donations and donors	Year of study		
	2004	2013	2017
Total n blood donations	71,897	100,920	105,323
FTD %	10.1	6.1	6.4
RD %	89.9	93.9	93.6
Total n donors	39,011	49,003	50,445
FTD %	18.6	12.6	13.4
RD %	81.4	87.4	86.6
Female (F) donors %	20.4	21	22.4
HBV prevalence/10 ⁵ FTD	220	97	29.6
HBV incidence/10 ⁵ RD	12.6	28	9.2
Anti-HBc tested	7,561	7,318	5,090
F donors %	17.4	13.1	16
M (male) donors %	82.6	86.9	84
Residual risk (RR) ^a	68	88	12
HBV Look-back/Trace back	4/0	11/0	4/0

^a Calculation of RR by European Medicines Agency 2016

FTD = first time donors; RD = repeat donors

2.3. Confirmation algorithms for anti-HBc reactivity

All donors tested anti-HBc positive in 2004, 2013 and 2017 were retested with the same anti-HBc assay and two alternative assays (Table 2). Repeatedly reactive (RR) samples confirmed with at least two anti-HBc assays were considered confirmed positive. All anti-HBc positive samples collected in 2004 and 2013 were tested for all HBV markers, whereas all anti-HBc positive samples from 2017 were tested only for anti-HBc IgM and anti-HBs. In all samples, HBsAg was also tested with an alternative test to exclude possible “s” mutations in the HBV genome. HBV DNA was tested in anti-HBc positive samples with a quantitative HBV DNA test (HBV Monitor/Cobas Amplicor, sensitivity of 54 IU/mL, and HPS/HBV Cobas TaqMan 48, sensitivity of 6 IU/mL) in 2004, and with ID-NAT assays in 2013 (Procleix Ultrio Plus test, 95 % LOD for HBV 3.4 IU/mL) and 2017 (Procleix Ultrio Elite test, 95 % LOD for HBV 4.3 IU/mL).

Table 2
HBV tests used for blood donor testing in the three studies.

Test	Year of study		
	2004	2013	2017
Anti-HBc screening test	Hepatitis B Virus Core Antigen ORTHO HBc ELISA Test System	Architect Anti-HBc II (Abbott)	Prism HBcore (Abbott)
Anti-HBc alternative test 1	ETI-AB-COREK PLUS (DiaSorin)	Monolisa Anti-HBc PLUS (Bio-Rad)	Architect Anti-HBc II (Abbott)
Anti-HBc alternative test 2	Vitros aHBc (Ortho)	Vidas Anti-HBc Total II (BioMerieux)	Vidas Anti-HBc Total II (BioMerieux)
HBsAg screening test	Enzygnost HBsAg 5.0 EIA (Dade-Behring)	Prism HBsAg (Abbott)	Prism HBsAg (Abbott)
HBsAg alternative test	Murex HBsAg Version 3	Monolisa HBsAg ULTRA (Bio-Rad)	Monolisa HBsAg ULTRA (Bio-Rad)
Anti-HBs	Vitros (Ortho)	Architect (Abbott)	Architect (Abbott)
Anti-HBc IgM	Vitros (Ortho)	Architect (Abbott)	Architect (Abbott)
Anti-HBe	Vitros (Ortho)	Architect (Abbott)	Not done
HBeAg	Vitros (Ortho)	Architect (Abbott)	Not done
HBV DNA test	HBV MONITOR/Cobas Amplikor (Roche) HPS/HBV Cobas TaqMan48 (Roche)	ID-NAT Procleix Ultrio Plus (HBV/HCV/HIV) (Grifols)	ID-NAT Procleix Ultrio Elite (HBV/HCV/HIV-1/HIV-2) (Grifols)

2.4. Anti-HBc avidity

Anti-HBc avidity was assessed by Rodella et al. (Rodella et al 2006). For each sample, two aliquots of 0.1 mL each were subjected to a pre-test dilution, respectively with the Architect working buffer (B) and with 1 M guanidine chloridate (G). Both aliquots were vortexed and incubated at room temperature for 30 min and then assayed for anti-HBc automated Architect Anti-HBc II assay (Abbott). The Avidity index has been calculated as the ratio of the S/CO

value obtained for the G aliquot divided by the S/CO value obtained for the B aliquot. The arbitrary cutoff for AI is set at 0.70 in order to discriminate acute from chronic (AI >0.70) phase of infection.

2.5. Statistical methods

The MedCalc v16.2.1 program was used for statistical analysis of results. A test of proportion (Chi-square test) with the 0.05 significance level was used for establishing the difference in the number of subjects/BDs according to various categories, anti-HBc prevalence, presence of HBV DNA and positivity for other HBV markers. Residual risk (RR) was calculated by the Guidelines on epidemiological data on blood transmissible infections (EMA 2016). The Robert G. Newcombe's method was used for calculating 95% of confidence intervals.

3. Results

3.1. Anti-HBc prevalence

Results are shown in Table 3. A statistically significant decrease in anti-HBc prevalence was observed in 2013 as compared with 2004 (from 5.24 % to 2.56 %; $\chi^2 = 75.741$; $P < 0.001$), as well as in 2017 as compared with 2013 (from 2.56 % to 1.32 %; $\chi^2 = 22.97$; $P < 0.05$). The difference in anti-HBc prevalence in 2013 resulted from a 5.90 % to 2.64 % decreased prevalence in repeat donors (RD) ($\chi^2 = 87.670$; $P < 0.001$), whereas the decrease in anti-HBc prevalence in 2017 as compared with 2013 is a result of decreased prevalence in RDs from 2.64 % to 1.38 % ($\chi^2 = 4.04$; $P < 0.05$) and in first time donors (FTD) from 0.88 % to 0.32 % ($\chi^2 = 1.669$; $P < 0.05$).

Anti-HBc prevalence has reduced by 4 times in the 14-year period (4.11 in male donors and 3.09 in female donors). Interestingly enough, the 2013/2017 prevalence reduction index of 1.94 has almost reached the reduction index of 2.05 achieved in the 9-year period between 2004 and 2013. The greatest prevalence reduction was recorded in age groups 25-40 (10-18 times).

Table 3
Anti-HBc prevalence in blood donors in the years of study.

Anti-HBc prevalence % (95 %CI) in the different groups of tested donors						
Year	Anti-HBc	FTD		RD		
	Anti-HBc-only					M
						F
2004	5.24 (4.76-5.77)	1.37 (0.83-2.25)		5.90 (5.35-6.50)		4.57 (3.57-5.84)
		F	M	F	M	5.38 (4.85-5.97)
	0.62 (0.47-0.82)	1.43 (0.61-3.30)	1.34 (0.73-2.45)	5.72 (4.42-7.37)	5.93 (5.34-6.59)	
2013	2.56 (2.22-2.95)	0.88 (0.30-2.56)		2.64 (2.29-3.04)		2.20 (1.44-3.34)
		F	M	F	M	2.61 (2.05-3.03)
	0.25 (0.16-0.39)	0.0 (0.00-2.56)	1.55 (0.53-4.45)	2.59 (1.70-3.93)	2.64 (2.27-3.07)	
2017	1.32 (1.04-1.67)	0.32 (0.06-1.80)		1.38 (1.09-1.75)		1.48 (0.85-2.57)
		F	M	F	M	1.31 (1.01-1.70)
	0.21 (0.12-0.39)	0.0 (0.00-3.15)	0.52 (0.09-2.89)	1.59 (0.89-2.82)	1.35 (1.04-1.75)	

FTD= first time donors; RD= repeat donors; F= female donors; M= male donors

3.2. Anti-HBc prevalence according to donor's age and gender

The greatest anti-HBc prevalence reduction in male BDs in 2013 was registered in the age groups 50-60, whereas a statistically significant reduction was registered in groups older than 30 years of age ($P < 0.05$). A statistically significant prevalence reduction ($P < 0.05$) in 2017 compared with 2013 was observed in all groups older than 20 years of age.

Anti-HBc prevalence reduction in female BDs in 2013 compared with 2004 was observed only in the age group 40-44 ($P = 0.03$), and the reduction is not statistically significant in 2017 as compared with 2013 ($\chi^2 = 1.24$; $P = 0.265$), except in the age groups of 25-34, 40-44 and 50-59 years ($P < 0.05$).

3.3. Anti-HBc prevalence in FTD and RD

Anti-HBc prevalence in the population of FTDs in 2013 (0.88 %) as compared with 2004 (1.37 %), as well as the prevalence in 2013 as compared with 2017 (0.32 %) does not indicate a statistically significant difference ($\chi^2=0.493$; $P=0.492$) / ($\chi^2=0.833$; $P=0.361$). A significant anti-HBc prevalence reduction in the population of RDs was registered in 2013 as compared with 2004, in all age groups ($\chi^2=88.457$; $P<0.01$) with the exception of the age group 20-24 ($\chi^2=1.217$; $P=0.27$). A reduction in prevalence in 2017 as compared with 2013 was registered in all age groups ($\chi^2=243.74$; $P<0.05$).

3.4. Anti-HBc-only prevalence

Anti-HBc-only prevalence in donors tested in 2004 was 0.62 %, whereas in 2013 it was 0.25 %, which showed a statistically significant difference ($\chi^2=11.65$; $P<0.01$). Anti-HBc-only prevalence in donors tested in 2017 was 0.21 %, implying a continuous decline trend; however, it is not significantly different as compared with 2013 ($\chi^2=0.206$; $P<0.650$). Shares of anti-HBc-only positives among anti-HBc positives amounted to 11.8 %, 9.6 % and 16.4 %, and the differences are not statistically significant ($\chi^2=0.46$; $P=0.497$) ($\chi^2=2.25$; $P=0.134$). Statistically significant difference was found in the frequency of anti-HBc-only positives among anti-HBc positives in blood donors younger than 30 years, resulting in a significant prevalence reduction (23 % in 2004 / 0 % in 2013 - $\chi^2=50.88$; $P<0.001$, and 0 % in 2017 - $\chi^2=19.14$; $P<0.001$).

3.5. Presence of other HBV markers

Testing results have identified almost the same frequency of anti-HBs (80.56 % and 87.57 %) and anti-HBe (37.12 % and 33.16 %) positives among anti-HBc positive BD in 2004 and 2013 ($\chi^2=3.12$; $P=0.077$) ($\chi^2=0.29$; $P=0.587$). No statistically significant difference was observed in anti-HBs positive rates among anti-HBc positive BDs from 2013 (87.57 %) and 2017 (82.09 %) ($\chi^2=1.03$; $P=0.310$). Anti-HBs titer greater than 100 IU/L was registered in 54.1 %, 55.1 % and 52.3 % of anti-HBc positives in the three groups with a statistically significant difference for all three years ($P<0.0001$). Anti-HBs titer greater than 200 IU/L was registered in 47.5 %, 43.2 % and 40.4 % of anti-HBc positive from 2004, 2013 and 2017 (statistically significant difference; $P<0.0001$).

3.6. Anti-HBc avidity

The anti-HBc IgG avidity was assessed in 99 anti-HBc positive BD's samples from 2013. The mean AI was 0,92 (95 %CI 0,89–0,94), median 0,91 (only one BD had AI 0.57), suggesting a long-standing infection.

3.7. HBV DNA tests in BD samples tested for anti-HBc

HBV DNA was tested in 47 anti-HBc-only positive BDs from 2004 and all samples tested negative. Similarly, no viral DNA was detected by ID-NAT in 7,318 and 5,090 BDs from 2013 and 2017, respectively.

4. Discussion

The results showed a significant reduction of anti-HBc prevalence from 5.24 % to 1.32 % over the 14-years period, mostly as a result of reduced prevalence in repeat blood donors (5.90 % vs. 1.38 %). The reduction in anti-HBc prevalence between 2004 and 2013 was not associated with gender (reduction index: repeat female BDs (F RDs)/reduction index: repeat male BD (M RDs) = 2.08/2.06), whereas prevalence reduction in male repeat donors was greater in 2017 compared to 2013 (F RDs/M RDs reduction index = 1.99/1.49). The greatest anti-HBc prevalence reduction in male repeat donors was observed in the 25-40 age group, and in female donors in the 40-49 age group. Possible general factors responsible for this anti-HBc prevalence reduction, apart from the RD's age shift, may be related to prevalence reduction in the general population due to the efficiency of preventive measures such as mandatory testing of pregnant women, universal vaccinations, safety levels in health-care and paramedic institutions, as well as of transfusion services, based on selection and testing of BDs, supported by national IT system and unique BD's database and centralised confirmatory testing. The important specific factor for reducing anti-HBc yield is certainly implementation of ID-NAT BD's testing in Croatia in 2013. Therefore, if the prevalence of anti-HBc in 2017 (1.32 %) is corrected for OBI BDs in CITM (total n=27, 2013 till 2017), anti-HBc prevalence would be 1.85 %.

Anti-HBc prevalence decrease in FTD (1.37 % in 2004, 0.88 % in 2013, and 0.32 % in 2017) was not significant between the years. Blood donors from 2004 were only sporadically vaccinated against HBV whereas the rate of vaccinated donors increased to 10.4 % in 2013 and 27.3 % in 2017 (donors younger than 25 and 30 years of age, respectively). Anti-HBc

prevalence in donors younger than 25 years of age was 0.32 % in 2013 (FTD 0 %, RD 0.37 %) and 0 % in 2017 (FTD 0 %, RD 0 %). Since the difference in anti-HBc prevalence in 2004/2013 and 2013/2017 among FTD is not statistically significant, it is reasonable to assume that exposure to HBV is continuously low in this age group. Croatia registers relatively few FTDs (approx. 10 %), and they are recruited in younger age groups. Hence, 81 % of FTDs tested for anti-HBc were younger than 29 in 2017, which would imply that they had received a mandatory vaccination against Hepatitis B virus.

Serological HBV profiles of anti-HBc positives did not change significantly over the period studied. The rate of anti-HBc-only among the anti-HBc positives was 11.8 % in 2004, 9.6 % in 2013 and 16.4 % in 2017. Similar prevalence were reported in studies conducted in England (11.8 %) (Allain 2017) and Italy among FTDs (10.4 %) (Romano et al. 2013). However, a statistically significant difference was found in the frequency of anti-HBc-only among the anti-HBc positives in blood donors younger than 30 years, mainly related to a general reduction of HBV prevalence in our donor population. Anti-HBs positive rates among anti-HBc positive BDs were very similar during all three periods (80.56 % in 2004, 87.57 % in 2013 and 82.09 % in 2017). The rates of BDs who were anti-HBs negative or having anti-HBs titer less than 100 IU/L (45.9 % in 2004, 44.9 % in 2013 and 47.7 % in 2017) or less than 200 IU/L (52.5 %, 56.8 % and 59.6 %, respectively) were very stable over the whole period studied. In 2004 the rate of anti-HBe positives among anti-HBc positives was 37.12 % and 33.16 % in 2013 indicating stable serological profile in HBsAg-negative and anti-HBc positive BDs. There was only one registered case of an anti-HBc IgM grey-zone result in 2004 and no case of HBe antigenemia.

HBV DNA or OBI was not detected in 2004 among 47 anti-HBc-only positives tested with an assay sensitivity of 6 and 54 IU/mL. The use of highly sensitive ID-NAT assays also failed to detect HBV DNA in 12,408 BDs in 2013 and 2017.

A simulation of introducing anti-HBc test in testing of BD in Croatia, based on anti-HBc prevalence in 2017 (1.32 %; 95 %CI 1.04 %–1.67 %) and 95,000 blood donors per year (18,000 FTDs and 77,000 RDs) and the annual average number of donations by repeat donors of 2.1 would lead to the loss of: a) 988-1,587 blood donors in case of universal testing with elimination of all anti-HBc positives, which would correspond to a loss of 1,869-2,999 blood donations a year, b) 472-758 blood donors in case of universal testing with elimination of all anti-HBs positives with a titer of less than 100 IU/L, which would correspond to a loss of 893-1,434 blood donations a year, c) 589-947 blood donors in case of universal testing with elimination

of all anti-HBs positives with a titer of less than 200 IU/L, which would correspond to a loss of 1,115-1,790 blood donations a year, and d) 11-326 blood donors in case of testing of first-time blood donors only.

However, the present study did not evidence the presence of OBI infection among anti-HBc positives. In the first year of testing blood donors in Croatia with ID-NAT tests (2013), the frequency of OBI was reported at 1:7,031, whereas after the 3-year period it was reported at 1:10,900 donations (Safic Stanic et al. 2017), followed by a further significant decrease: 1:98,494 in 2016, 1:28,495 in 2017 (in CITM 1:30,932) and 1:195,815 in 2018. But the frequency of anti-HBc positive blood donors in the CITM was 1:19 in 2013 and 1:76 in 2017. RR decreases, from 67/10⁶ donations in 2004, 88/10⁶ in 2013 and 12/10⁶ in 2017. The analysis of 23 OBI donor archive samples showed the consistency of anti-HBc positive results (100%), as opposed to ID-NAT (63 %) and ID-NAT reproducibility (50 %), as expected for samples with a low HBV DNA viral load (Mihaljević et al. 2014). Those data support the importance of anti-HBc testing in identifying OBI donors.

5. Conclusion

During the period 2004-2017, a significant 4-times decrease in anti-HBc prevalence in Croatian blood donors from 5.24 % to 1.32 % was observed. No OBI infection among anti-HBc positive BDs was detected in this study. Due to the high consistency of anti-HBc in Croatian OBI BDs, a strategy of universal testing of blood donors for this marker in addition to existing HBsAg and ID-NAT screening in Croatia would represent an additional measure to prevent HBV transmission by blood and blood components. By deferring all anti-HBc positive donors, at least 1.32 % of blood donors should be substituted. Testing of FTDs only would be a less efficient method of risk reduction because: a) in Croatia OBI donors have been identified only in RDs (age group 43-67, M 58 years), b) FTDs mostly consist of young people who have already been vaccinated against HBV virus, and c) results from the most recent study have identified no anti-HBc positives among donors younger than 29 years of age. The decision to include mandatory anti-HBc testing in the existing BD screening strategy needs to be supported by further cost-benefit analyses.

Keywords: blood donors, anti-HBc seroprevalence, OBI

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. VIRUSNI HEPATITIS.....	2
1.1.1. Infekcija virusom hepatitisa B (HBV)	2
1.1.2. Globalna epidemiologija hepatitisa B.....	3
1.1.3. Epidemiologija hepatitisa B u Republici Hrvatskoj.....	6
1.1.4. Putevi prijenosa hepatitisa B.....	8
1.1.5. Prirodni tijek HBV infekcije	9
1.1.5.1. Akutni hepatitis B.....	10
1.1.5.2. Kronični hepatitis B (KHB).....	12
1.1.5.3. Okultni hepatitis B (OBI)	14
1.1.6. Prevencija hepatitisa B.....	16
1.1.7. Liječenje hepatitisa B.....	17
1.2. VIRUS HEPATITISA B	18
1.2.1. Otkriće HBV-a	18
1.2.2. Klasifikacija HBV-a.....	19
1.2.3. Struktura i morfologija HBV-a	19
1.2.4. Genomska struktura	21
1.2.5. Virusni proteini	23
1.2.5.1. Strukturni proteini.....	23
1.2.5.1.1. Sržni (engl. core) proteini	23
1.2.5.1.2. HBV polimeraza	24
1.2.5.2. Površinski proteini	24
1.2.5.3. Nestrukturni proteini.....	27
1.2.5.3.1. HBeAg (opisan u poglavlju 1.2.5.1.1.).....	27
1.2.5.3.2. HBx protein	27
1.2.6. Replikacija virusa.....	27
1.2.7. Mutacije virusa.....	30
1.3. LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA VIRUSNOG HEPATITISA B.....	31
1.4. VAŽNOST DETEKCIJE ANTI-HBc-a U OTKRIVANJU OBI-ja U TRANSFUZIJSKOJ MEDICINI	34
1.5. STRATEGIJE TESTIRANJA DAVATELJA KRVI NA HBV DANAS	38

1.6. SVRHA I CILJEVI RADA	40
2. MATERIJALI I METODE	41
2.1. MATERIJALI	42
2.1.1. Uzorci krvi DDK-a HZTM-a	42
2.1.2. Analizatori	42
2.1.3. Kemikalije i testovi	43
2.1.3.1. Kemikalija korištena za pripremu uzoraka u određivanju avidnosti anti-HBc IgG-a	43
2.1.3.2. Testovi	43
2.2. METODE	45
2.2.1. Serološke metode	45
2.2.1.1. Hepatitis B Virus Core Antigen ORTHO HBV ELISA Test System, Ortho Clinical Diagnostic, SAD - izvođen na ORTHO Summit Processoru	45
2.2.1.2. ETI-AB-COREK PLUS, DiaSorin - izvođen na ETI-Max 3000 analizatoru	46
2.2.1.3. Architect Anti-HBc II test, Abbott - izvođen na automatkom analizatoru Architect i2000 _{SR} analizatoru	47
2.2.1.4. Monolisa Anti-HBc PLUS, Bio-Rad - izvođen na Evolis analizatoru	47
2.2.1.5. Prism HBcore, Abbott – izvođen na automatskom Prism analizatoru	48
2.2.1.6. Vitros Anti-HBc test, Ortho Clinical Diagnostic – izvođen na automatskom analizatoru Vitros ECi	49
2.2.1.7. Vidas Anti-HBc Total II, bioMerieux – izvođen na automatskom analizatoru Vidas	50
2.2.1.8. Enzygnost HBsAg 5.0 EIA, Dade-Behring / Siemens – izvođen ja na BEP III analizatoru	50
2.2.1.9. Murex HBsAg Version 3, Murex – izvođen je na analizatoru ORTHO Summit Processor, Ortho Clinical Diagnostic, SAD	51
2.2.1.10. Prism HBsAg, Abbott – izvođen na automatskom analizatoru Prism	52
2.2.1.11. Monolisa HBsAg ULTRA, Bio-Rad – izvođen na anlizatoru Evolis	52
2.2.2. Molekularne metode	53
2.2.2.1. COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Test, version 2.0.	54
2.2.2.2. Procleix Ultrio Plus test	54

2.2.2.3. Procleix Ultrio Elite test	56
2.2.3. Metoda za određivanje avidnosti anti-HBc IgG-a	57
2.2.4. Algoritam potvrde anti-HBc reaktivnosti	57
2.2.5. Statističke metode	58
2.2.5.1. Izračun ostatnog rizika od prijenosa HBV-a krvnim pripravcima donacija DDK-a ispitanih važećim obveznim testovima na HBV	58
3. REZULTATI	61
3.1. UVODNI PREGLED REZULTATA.....	62
3.2. KARAKTERISTIKE DAVALAŠTVA HZTM-a PO ISPITNIM GODINAMA... 63	
3.2.1. Osnovne karakteristike davalastva DDK-a HZTM-a po ispitnim godinama.....	63
3.2.2. Broj DDK-a uključenih u istraživanje razvrstan prema spolu i broju davanja krvi	65
3.2.3. Udjeli dobnih skupina DDK-a uključenih u istraživanje.....	66
3.3. PREVALENCIJA ANTI-HBc-a U POPULACIJI DDK-a HZTM-a PO ISPITNIM GODINAMA	67
3.3.1. UKUPNA PREVALENCIJA ANTI-HBc-a U ISPITANIH DDK-a	67
3.3.2. PREVALENCIJA ANTI-HBc-a PO DOBNIM SKUPINAMA DDK-a	68
3.3.3. PREVALENCIJA ANTI-HBc-a PREMA SPOLU DDK-a.....	73
3.3.3.1. Prevalencija anti-HBc-a u muških DDK-a	73
3.3.3.2. Prevalencija anti-HBc-a u ženskih DDK-a.....	78
3.3.4. PREVALENCIJA ANTI-HBc-a U ISPITANIH DDK-a PREMA BROJU DAVANJA KRV I	83
3.3.4.1. Prevalencija anti-HBc-a u novih DDK-a.....	83
3.3.4.2. Prevalencija anti-HBc-a u višestrukih DDK-a	88
3.3.5. SKUPNI PRIKAZ UTVRĐENE ANTI-HBc PREVALENCIJE PO SVIM SKUPINAMA ISPITANIH DDK-a	93
3.4. INDEKS PADA PREVALENCIJE ANTI-HBc-A U POPULACIJI DDK-a U ISPITIVANOM RAZDOBLJU	95
3.5. PREVALENCIJA ANTI-HBc-ONLY POZITIVNIH DDK-a	96
3.6. REZULTATI OSTALIH SEROLOŠKIH ISPITIVANJA NA HBV BILJEGE ...	97
3.6.1. HBsAg.....	97
3.6.2. Anti-HBs	97
3.6.3. Anti-HBe.....	102
3.6.4. Anti-HBc IgM.....	102
3.7. REZULTATI MOLEKULARNIH ISPITIVANJA.....	103

3.8. REZULTATI ODREĐIVANJA AVIDNOSTI ANTI-HBc IgG-a.....	103
3.9. ANALIZA RAZINE RAKTIVNOSTI (S/CO) U ARCHITECT ANTI-HBc II TESTU	103
3.10. PREVALENCIJA OBI-ja U POPULACIJI DDK-a	105
3.11. OSTATNI RIZIK	106
4. RASPRAVA.....	109
4.1. SMANJENE RIZIKA OD PRIJENOSA HBV-a TRANSFUZIJAMA KRVI.....	111
4.1.1. Selekcija davatelja krvi	111
4.1.2. HBsAg test i HBV prevalencija	111
4.1.3. Anti-HBc test	112
4.1.3.1. Anti-HBc prevalencija	112
4.1.3.2. Anti-HBc test kao suplementni test u algoritmu potvrde NRR ID-NAT rezultata	114
4.1.4. Molekularni (NAT-HBV/HVC/HIV) testovi probira	115
4.2. OBI U DOBROVOLJNIH DAVATELJA KRVI	115
4.3. SEROLOŠKI PROFILI ANTI-HBc POZITIVNIH DDK-a	117
4.4. OSTATNI RIZIK OD PRIJENOSA HBV-a TRANSFUZIJAMA KRVI.....	118
4.5. SIMULACIJA UVOĐENJA ANTI-HBc TESTA KAO OBVEZNOG TESTA U TESTIRANJE KRVI DOBROVOLJNIH DAVATELJA U REPUBLICI HRVATSKOJ.....	120
5. ZAKLJUČCI.....	Error! Bookmark not defined.
6. LITERATURA.....	124
7. PRILOG	141
8. ŽIVOTOPIS	155
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....	158
BASIC DOCUMENTATION CARD.....	159

POPIS KRATICA

Ag	antigen
ak	aminokiselina
ALT	alanin-aminotransferaza
Anti-HBe	protutijela na hepatitis B e antigen
Anti-HBs	protutijela na hepatitis B površinski antigen
AST	aspartat-aminotransferaza
At	protutijelo
AuAg	australski antigen (HBsAg)
AUG	startni kodon
CCAAT	usuglašeni promotorski slijed
cccDNA	kovalentno zatvorena cirkularna DNA (<i>engl.</i> covalently closed circular DNA)
CFR	reakcija fiksacije komplementa (<i>engl.</i> Complement Fixation Reaction)
ChLIA	kemiluminescentni imunotest (<i>engl.</i> ChemiLuminescent ImmunoAssay)
CI	interval pouzdanosti (<i>engl.</i> Confidence Interval)
CMIA	kemiluminescentni imunotest na mikročesticama (<i>engl.</i> Chemiluminescent Microparticle ImmunoAssay)
CO	vrijednost razgraničenja (<i>engl.</i> cut-off)
C-ORF	kodirajuća regija za HBeAg i HBcAg
DDK	dobrovoljni davatelj krvi
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
ds DNA	dvolančana DNA
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EIA	enzimski imunotest (<i>engl.</i> Enzyme Immuno Assay)
ELFA	fluorescentni enzimski imunotest (<i>engl.</i> Enzyme-Linked Fluorescent Immuno Assay)
ELISA	enzimski adsorpcijski imunotest (<i>engl.</i> Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)
ER	endoplazmatski retikul

G	gvanin
GA	Golgijev aparat
GRE	element odgovoran za glukokortikoide (<i>engl.</i> Glucocorticoid-Responsive Element)
HBcAg	hepatitis B sržni (<i>engl.</i> core) antigen
HBeAg	hepatitis B e antigen
HBIG	hepatitis B imunoglobulin
HBsAg	hepatitis B površinski (<i>engl.</i> surface) antigen
HBV	virus hepatitisa B
HCC	hepatocelularni karcinom (<i>engl.</i> HepatoCellular Carcinoma)
HCV	virus hepatitisa C
HDV	virus hepatitisa D
HIV	virus humane imunodeficijencije (<i>engl.</i> Human Immunodeficiency Virus)
HPA	hibridizacijski test (<i>engl.</i> Hibridization Protection Assay)
Hsp	protein toplinskog stresa (<i>engl.</i> Heat-shock protein)
HSPG	heparan-sulfat proteoglikan
HZTM	Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu
ID-NAT	individualno molekularno testiranje na prisustvo nukleinske kiseline
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
INF	interferon
KHB	kronični hepatitis B
LHBs	mali HBsAg
MHBs	srednji HBsAg
MHR	najveća hidrofilna regija (<i>engl.</i> Major Hydrophilic Region)
mRNA	glasnička (<i>engl.</i> messenger) RNA
MSM	muškarci koji prakticiraju seks s muškarcima

MVB	multivezikularna tijela (<i>engl.</i> Multi Vesicular Bodies)
NAT	testiranje za detekciju nukleinskih kiselina (<i>engl.</i> Nucleic Acid Testing)
NK	stanice ubojice (<i>engl.</i> Natural Killer)
NRE	negativni regulatorni element (<i>engl.</i> Negative Regulating Element)
nt	nukleotid
NPC	kompleks jezgrinih pora (<i>engl.</i> Nuclear Pore Complex)
NTCP	natrij taurokolat kotransportni polipeptid (<i>engl.</i> sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide)
NUC	analozi nukleoz(t)ida (<i>engl.</i> NUCleos(t)ide analogue)
OBI	okultna infekcija virusom hepatitisa B (<i>engl.</i> Occult hepatitis B Infection)
OPD	<i>o</i> -fenilen diamin
ORF	otvoreni okvir za čitanje (<i>engl.</i> Open Reading Frame)
PEG-INF	pegilirani interferon
pg	pregenomska (RNA)
pol	polimeraza
POL-ORF	kodirajuća regija za virusnu polimerazu
PRE	posttranskripcijski regulatorni element (<i>engl.</i> Posttranscriptional Regulation Element)
rHBcAg	rekombinantni HBcAg
RIA	radioimuno test (<i>engl.</i> Radio Immuno Assay)
RLU	relativne jedinice svjetla (<i>engl.</i> Relative Light Units)
RNA	ribonukleinska kiselina
RR	ostatni rizik (<i>engl.</i> Residual Risk)
S	vrijednost reaktivnosti za ispitani uzorak krvi
S/CO	omjer očitavanja uzorka (S) i cutoff-a
SHBs(Ag)	mali HBsAg
S-ORF	kodirajuća regija za HBsAg
SPR	nositelj čvrste faze (<i>engl.</i> Solid Phase Receptacle)

TMA	amplifikacija nukleinske kiseline putem transkripcije (<i>engl.</i> Transcription-Mediated Amplification)
TMB	tetrametilbenzidin
VL	virusni titar (<i>engl.</i> Viral Load)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (<i>engl.</i> World Health Organization)
WP	<i>window period</i>
X-ORF	kodirajuća regija za X-protein

1. UVOD

1.1. VIRUSNI HEPATITIS

1.1.1. Infekcija virusom hepatitisa B (HBV)

Virusni hepatitis B jest upala jetre uzrokovana virusom hepatitisa B (HBV). Tijek infekcije ovisi o količini virusa (razini replikacije virusa), imunom odgovoru domaćina, dobi u kojoj je infekcija stečena i spolu. HBV izaziva akutni i/ili kronični hepatitis (Feitelson i sur., 1986). Poznate su tri stadija HBV infekcije: akutni, kronični (u koji spada i okultni hepatitis B (*engl.* Occult hepatitis B Infection, OBI)) i fulminantni hepatitis B. Prosječno inkubacijsko razdoblje za hepatitis B je 75 dana, a varira od 30 do 180 dana. Izvan tijela HBV može preživjeti oko 7 dana. Virus se može detektirati 30 do 60 dana nakon infekcije i može perzistirati i izazvati kronični hepatitis B.

Ako je odrasla imunokompetenta osoba inficirana niskom dozom virusa, u 95 % slučajeva događa se eliminacija virusa i imunost. Ako se takva osoba inficira visokom dozom HBV-a, to može dovesti do akutnog hepatitisa B koji je karakteriziran simptomima sličnim gripi, umorom, abdominalnom boli i žuticom. U zemljama niske prevalencije akutni se hepatitis B javlja uglavnom u populacijama s visokim rizikom od infekcije, kao što su muškarci koji prakticiraju seks s muškarcima (*engl.* Men who have Sex with Men, MSM) i intravenski ovisnici. Međutim, u manje od 1 % akutno zaraženih može se razviti fulminantni hepatitis koji, ako se ne liječi, izaziva smrt za nekoliko dana zbog fatalnog zatajenja jetre.

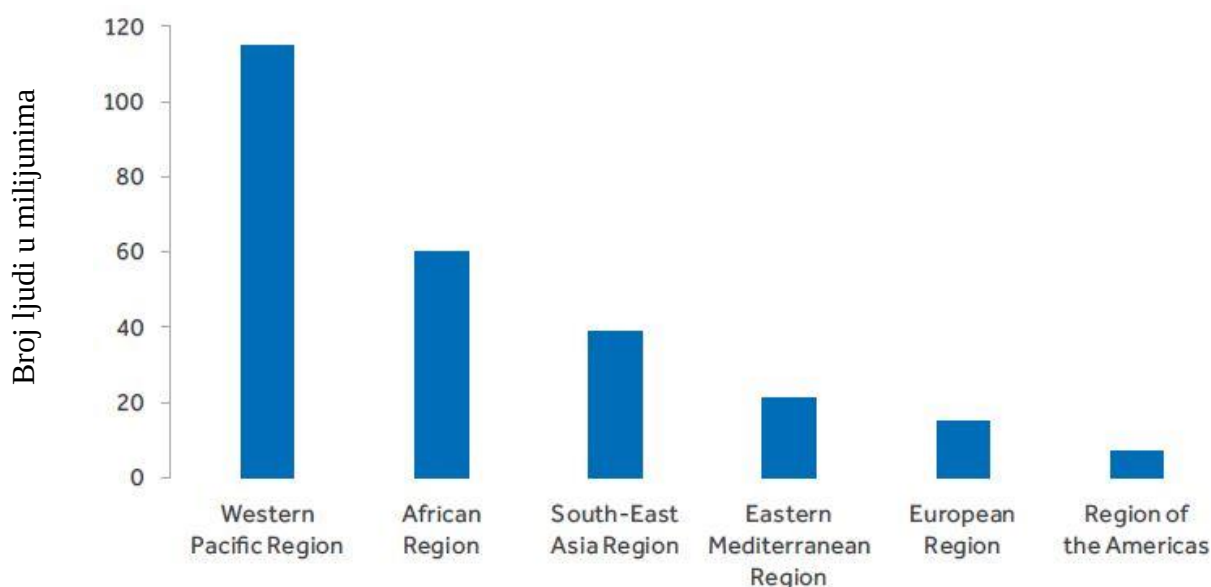
U 90 % svih HBV inficiranih (pogotovo zaražene djece preko majki) i 5 % odraslih razvija se kronična infekcija koja može godinama biti asimptomatska, čak 30 godina i više prije pojave kliničkih simptoma bolesti, te progradira u perzistentni hepatitis, cirozu i hepatocelularni karcinom (*engl.* HepatoCellular Carcinoma, HCC). Učestalost HCC-a je u korelaciji s virusnim opterećenjem/titrom (*engl.* Viral Load, VL), zbog čega bi se sve zaražene osobe trebale liječiti kako bi se smanjio VL, odnosno rizik od HCC-a (Conjeevaram i sur., 2003).

Za sada je ljudski HBV podijeljen u 10 glavnih genotipova (A do J), bazirano na više od 8 % nukleotidnih varijacija cijelog genoma. Osim na molekulskoj razini i zemljopisnoj raspodjeli, razlikuju se po jačini mutacije, odgovoru na terapiju, kliničkoj manifestaciji i učestalosti mutacija. Kako su genotipovi povezani s hepatokarcinogenezom, važno je poznavati genomske varijante u određenoj populaciji (Sung i sur., 2008). Genotipovi se dalje mogu

podijeliti na nekoliko subgenotipova (više od 4 % nukleotidnih varijacija). Razdioba genotipova HBV-a u svijetu odraz je prevalentne etničke distribucije (Bartholomeusz i Schaefer, 2004), a genotip D je najučestaliji. U Republici Hrvatskoj učestalost genotipa A je 8 %, a genotipa D 80 % (Deterding i sur., 2008). Odgovor na terapiju kronične HBV infekcije ovisi i o genotipu i subtipu virusa, a terapija se provodi u kroničnoj infekciji.

1.1.2. Globalna epidemiologija hepatitisa B

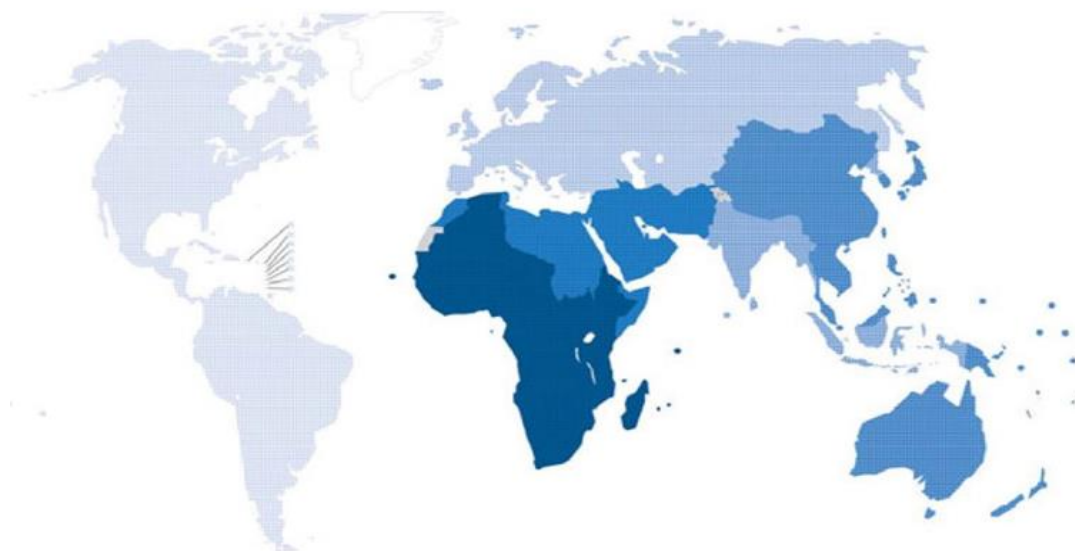
HBV infekcija usprkos specifičnih mjera prevencije i dalje predstavlja globalni javno zdravstveni problem. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (*engl.* World Health Organization, WHO) iz 2017. godine (Global Hepatitis Report, 2017) u 2015. godini je oko 257 milijuna ljudi živjelo s HBV infekcijom (što je oko 3,5 % populacije). Epidemije uzrokovane HBV-om zabilježene su u Africi i Zapadnom Pacifiku. Prevalencije HBV infekcije, odnosno HBsAg-a, prikazane su na *slici 1.1.*



Slika 1.1. Prevalencija HBV (HBsAg) infekcije u općoj populaciji u 2015. godini. (Prevlencija po regijama u %: Afrika – 6,1; Amerika – 0,7; Istočni Mediteran – 3,3; Europa –

1,6; Jugo-istočna Azija – 2,0; Zapadni Pacifik – 6,2.). Preuzeto i prilagođeno (uz dopuštenje nakladnika) iz *Global Hepatitis Report*, 2017.

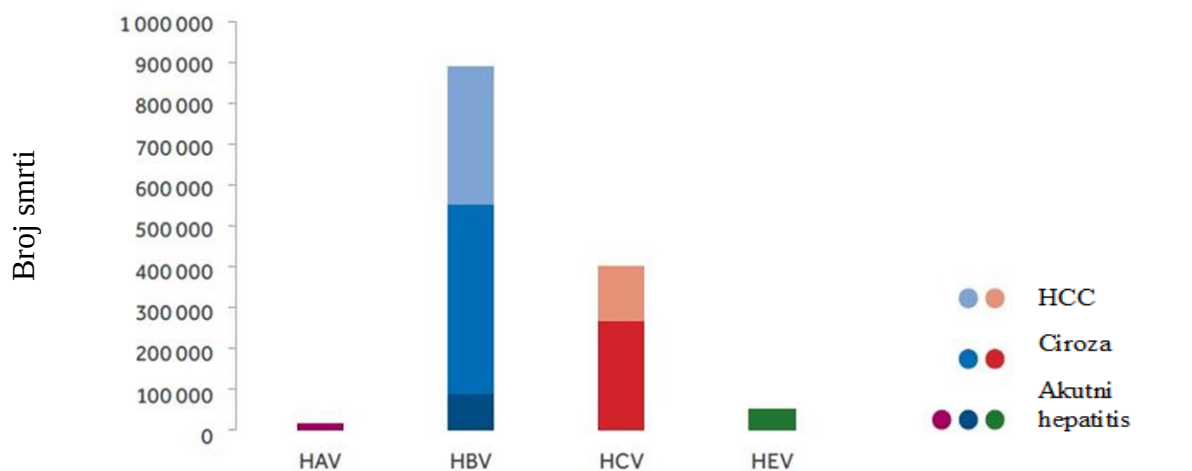
Najveći učinak u suzbijanju HBV infekcije je uspješno cijepljenje. Globalno se cijepljenje s tri doze cjepiva 2015. godine provodilo se u 84 % zemalja. To je dovelo do smanjenja prijenosa HBV-a u prvih pet godina života, odnosno do smanjenja prevalencije HBV-a u djece s 4,7 % (prije uvođenje cijepljenja) na 1,3 %, *slika 1.2*. Međutim, inicijalnu dozu cjepiva po rođenju dobije svega 39 % djece.



Slika 1.2. Kumulativna incidencija kronične HBV infekcije u 2015. godini u djece mlađe od 5 godina nakon uvedenog cijepljenja. (Prevlencija HBsAg-a po regijama u %: Afrika – 3; Amerika – 0,2; Istočni Mediteran – 1,6; Europa – 0,4; Jugo-istočna Azija – 0,7; Zapadni Pacifik – 0,9.) Preuzeto (uz dopuštenje nakladnika) iz *Global Hepatitis Report*, 2017.

Ograničen je i pristup testiranju na virusne hepatitis pa je tako svega 9 % ljudi inficiranih HBV-om dijagnosticirano (22 milijuna), od kojih se svega 8 % (1,7 milijuna) liječi.

Virusni hepatitisi 2015. godine uzrokovali su oko 1,34 milijuna smrti, *slika 1.3*, od čega 66 % zbog komplikacija kronične HBV infekcije (ciroza i/ili HCC).



HAV: hepatitis A virus; HBV: hepatitis B virus; HCV: hepatitis C virus; HEV: hepatitis E virus; HCC: hepatocelularni karcinom

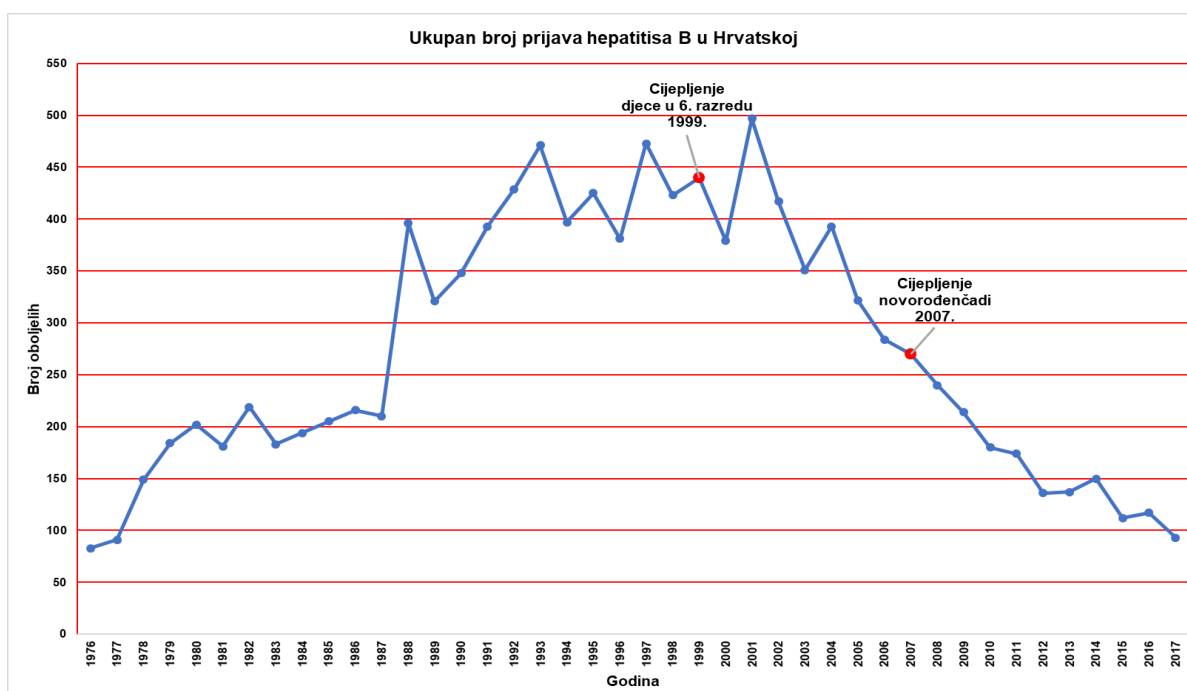
Slika 1.3. Smrti zbog virusnih hepatitisa u 2015. godini. Preuzeto i prilagođeno (uz dopuštenje nakladnika) iz *Global Hepatitis Report, 2017*.

Prema podacima globalne sustavne analize (Global Burden of Diseases 2015 Collaborators) globalna incidencija hepatitisa B 2015. godine bila je 111,212.000, što je u odnosu na 2005. godinu porast od 13,2 %, dok je globalna prevalencija 2015. godine bila 356,083.400, što je u odnosu na 2005. godinu statistički značajan porast od 2,8 %. Globalna prevalencija akutnog hepatitisa B 2015. godine bila je 12,832.200 (u odnosu na 2005. godinu porast od 1 %), a kroničnog 343,251.200 (statistički značajan porast od 2,8 %).

1.1.3. Epidemiologija hepatitisa B u Republici Hrvatskoj

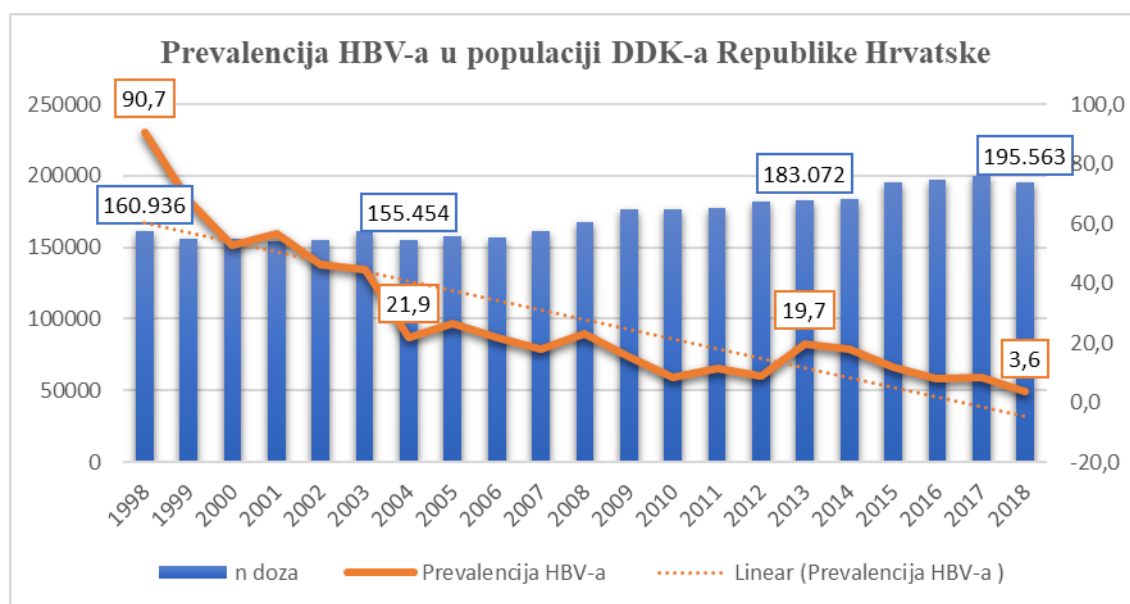
Ukupan broj prijava hepatitisa B u Hrvatskoj prema Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo (dostupno na: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2018/11/ZBVHR_2017_Final.pdf) prikazan je na *slici 1.4*. Imunizacija usmjerena na hepatitis B obvezatna je za sve osobe u zdravstvenim i drugim ustanovama, kao i za zdravstvene djelatnike u privatnoj praksi koji su pri obavljanju svog posla pojačano izloženi zarazi, odnosno pri obavljanju svog posla dolaze u neposredan dodir sa zaraženim osobama i zaraženim materijalom (krv, ekskreti, sekreti).

Imunizacija usmjerena na hepatitis B obvezatna je i za novorođenčad, bolesnike na hemodijalizi, spolne partnere HBsAg pozitivnih osoba, osoblje zavoda za duševno zaostale osobe, intravenske ovisnike o opojnim drogama, bolesnike koji boluju od hemofilije i leukemije i obiteljske kontakte HBsAg pozitivnih osoba. Cijepljenje djece usmjereno na hepatitis B započelo je 1999. godine i to djece u šestom razredu osnovne škole, odnosno 12-godišnjake, a 2007. godine i sve novorođenčadi. Pojavnost akutnog hepatitisa B je s oko 5/100.000 1999. godine, pala 2012. na manje od 1/100.000 stanovnika, a kronično nosilaštvo se procjenjuje na 0,7 % (0,4 do 1,2 %). Značajno je da je u zadnjih 20-tak godina došlo do redukcije akutnog hepatitisa B za 75,6 %, i nosilaštva HBsAg za 60,7 % u dobnoj skupini od 15 do 29 godina starosti. Najviše nosilaca HBV infekcije je u skupini od 30 do 39 godina.



Slika 1.4. Ukupan broj prijava hepatitisa B u Hrvatskoj. Od 1976. do 1987. godine prijavljivao se samo hepatitis B, a od 1988. godine prijavljuje se i HBsAg nosilaštvo. Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo od 23. studenog 2018. dobivenih elektronskom poštom.

HBV trendovi i u populaciji davatelja krvi u Europi imaju negativan predznak od 4 % za nove i 9 % za višestruke davatelje krvi (ECDC, 2016). HBV prevalencija izražena na 100.000 doza krvi dobrovoljnih davatelja prikupljenih u Republici Hrvatskoj od 1998. do 2018. godine prikazana je na *slici 1.5*.



Slika 1.5. HBV prevalencija na 10^5 doza krvi i ukupan broj doza krvi prikupljenih u Hrvatskoj od 1998. do 2018. godine. Prevalencija od 1998. do 2012. godine temelji se na potvrđeno pozitivnom HBsAg-u, a 2013. do 2018. godine na HBsAg i/ili HBV-ID-NAT testovima.

1.1.4. Putevi prijenosa hepatitisa B

Izvor zaraze HBV infekcije jesu akutno ili kronično zaražene osobe čija krv, sjemenja tekućina, slina, izmet, urin, žuč, likvor, znoj, suze, mlijeko i krv iz pupkovine sadrže virus. Najveća koncentracija virusa dokazana je u serumu i seroznim sekretima. Najčešće se infekcija prenosi krvlju, sjemenom tekućinom i slinom, dok su majčino mlijeko i urin malovjerojatni put prijenosa (Hill i sur., 2002). Tijekom kontakta s tjelesnim tekućinama ili kontaminiranim priborom, HBV ulazi u organizam kroz oštećenu kožu i/ili sluznicu. Važno je znati da učinkovitost prijenosa ovisi o koncentraciji virusa, prisutnosti HBeAg-a u krvi, i virusnim varijantama koje imaju izraženiju sposobnost replikacije (Hindman i sur., 1976; Shikata i sur., 1977).

Govori se o tri osnovna načina prijenosa HBV-a: spolni, perkutani/parenteralni i perinatalni. Spolni način prijenosa je najčešći put prijenosa u mladih osoba i globalno na spolni put prijenosa otpada 80 do 85 % svih infekcija. U razvijenim zemljama češće je zastupljen u

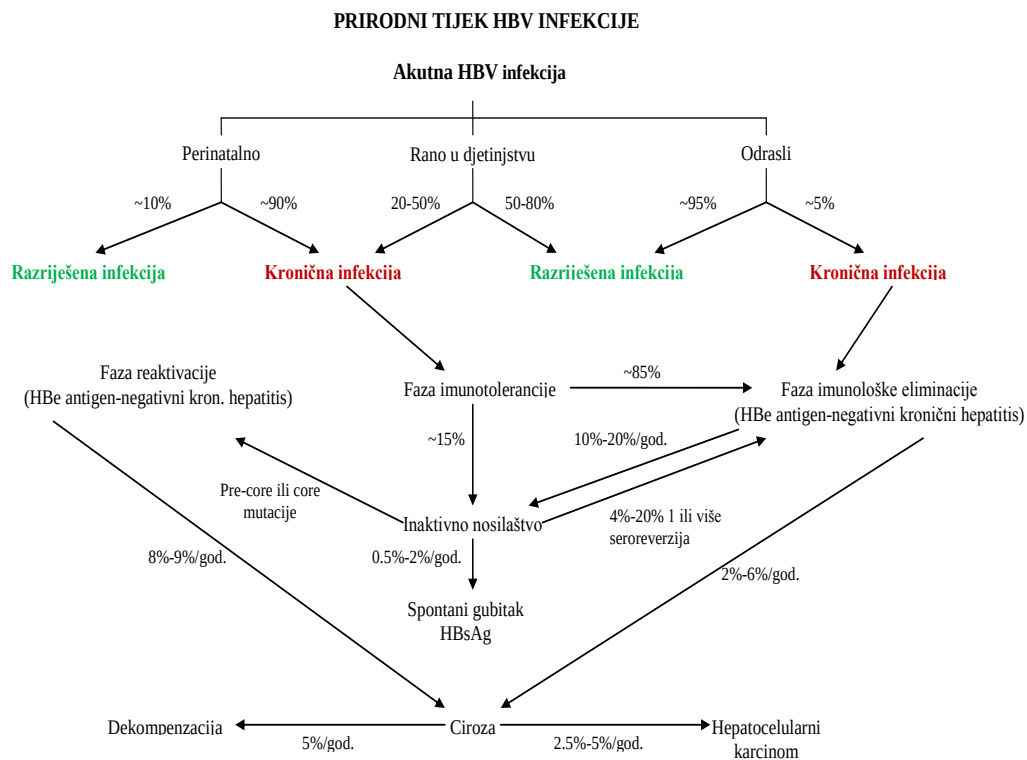
MSM populaciji, nego u ostatku populacije (Inoue i Tanaka, 2016), s učešćem od 70 % infekcije nakon 5 godina od stupanja u spolne odnose (Alter, 2003).

Perkutani put prijenosa uključuje ulazak virusa kroz oštećenu kožu i sluznicu i to preko zaraženog pribora. Oko 15 do 25 % akutnih HBV infekcija u razvijenim zemljama odnosi se na ovakav prijenos u populaciji intravenskih ovisnika. Parenteralni put prijenosa povezivao se s transfuzijama krvi (Alter i sur., 1975). Međutim, nakon uvođenja HBsAg testa u rutinsko testiranje davatelja krvi 1971. godine, ovakav prijenos HBV infekcije je rijedak. Procjenjuje se da se putem krvi prije uvođenja HBsAg testa inficiralo 6 % primatelja krvi, a uz HBsAg test 0,3 do 1,7 % primatelja krvi ili manje, dok je u zemljama koje provode testiranje na prisutnost nukleinske kiseline, NAT (od *engl.* Nucleic Acid Testing), 0,0015 % primatelja krvi zaraženo transfuzijama krvi (Niederhauser, 2011). Perkutani prijenos HBV-a uključuje i hospitalne infekcije i paramedicinske zahvate (tetoviranje, akupunktura i *body piercing*). Procjenjuje se da se nesterilnim radom/priborom godišnje HBV-om zarazi oko 21 milijun ljudi u svijetu, što je trećina ukupno zaraženih. Najviše putem nesterilnih injekcija ili njihovom ponovnom uporabom i uporabom multidoznih lijekova (Hutin i sur., 1999; Alter i sur., 1983; Hauri i sur., 2004). Rizik od prijenosa HBV-a u zdravstvenih djelatnika nakon perkutanog ili mukozalnog kontakta sa zaraženom krvi ili tjelesnim tekućinama pacijenata je 6 do 30 % (Beltrami i sur., 2000).

Perinatalni prijenos nastaje intrauterino kroz oštećenu placentu ili tijekom poroda i kasnije dojenjem ili drugim bliskim kontaktom majke i djeteta. Učinkovitost prijenosa virusa povezana je s HBeAg nosilaštvom, VL-om i prijevremenim porodom kod majke (Stevens i sur., 1975; Yan i Xu, 1999). Rijedak je prijenos u razvijenim zemljama za razliku od npr. Azije gdje je ovaj put prijenosa dominantan.

1.1.5. Prirodni tijek HBV infekcije

HBV infekcija jest dinamički proces karakteriziran HBV replikativnim i nereplikativnim fazama baziranih na interakciji virusa (replikacija, genotip, varijanta, koinfekcija) i domaćina (starost, spol, stadij jetrene bolesti, ponavljajući hepatitis, zadržana normalizacija alanin-aminotransferaze (ALT), unos alkohola i imunostna sposobnost) (Fattovich, 2003). Prirodni tijek HBV infekcije prikazan je na *slici 1.6.* (Elgouhari i sur., 2008).



Slika 1.6. Prirodni tijek HBV infekcije. Preuzeto i prilagođeno (uz dopuštenje nakladnika) iz Elgouhari i sur. 2008.

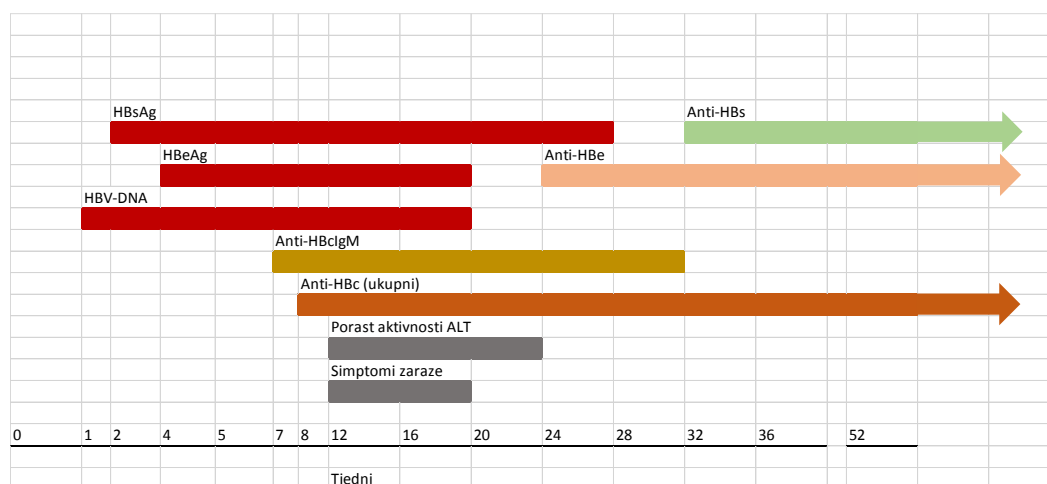
1.1.5.1. Akutni hepatitis B

Akutni hepatitis je općenito subklinički i anikterični u djece, međutim, 30 do 50 % odraslih razvije ikterični hepatitis (McMahon i sur., 1985). Simptomi akutnog hepatitisa B su umor, mučnina, malaksalost, a biokemijski najznačajnije su promjene jetrenih funkcionalnih testova – porast aktivnosti aspartat-aminotransferaze (AST) i ALT-a, ponekad i iznad 1000 IU/L. U ikteričnoj fazi, koncentracija bilirubina također raste, najčešće nakon povišenja ALT-a. Iako katalitička aktivnost ALT-a reflektira hepatocelularno oštećenje, ona nema prognostičku vrijednost. ALT se normalizira za 1 do 4 mjeseca. Pacijenti koji se oporave od akutnog hepatitisa B razviju zaštitna anti-HBs protutijela koja su doživotna zaštita. Međutim, jedan dio pacijenata bit će kronično zaražen i oko 0,1 do 0,5 % razvit će akutni fulminantni hepatitis.

Koinfekcije HBV-a virusom hepatitisa D (HDV) ili virusom hepatitisa C (HCV) povećavaju rizik od fulminantnog hepatitisa (Smedile i sur., 1982; Feray i sur., 1993). Vjeruje se da fulminantni hepatitis nastaje zbog snažne imunosne aktivacije domaćina što rezultira inhibicijom virusne replikacije i masivne lize inficiranih hepatocita, a što objašnjava odsusutvo seroloških biljega u mnogih pacijenata (Wright i sur., 1992). Prisustvo HBsAg-a, HBeAg-a i visoki titar HBV DNA duže od 6 mjeseci znači progresiju u kroničnu HBV infekciju (Fong i sur., 1994).

Starost u vrijeme infekcije najbolje determinira razvoj kroniciteta. Do 90 % novorođenčadi od visoko infektivnih HBsAg i HBeAg pozitivnih majki postanu kronični nositelji HBV-a, za razliku od oko 30 % inficirane djece nakon neonatalnog perioda, a prije pete godine života (McMahon i sur., 1985; Chang, 2000).

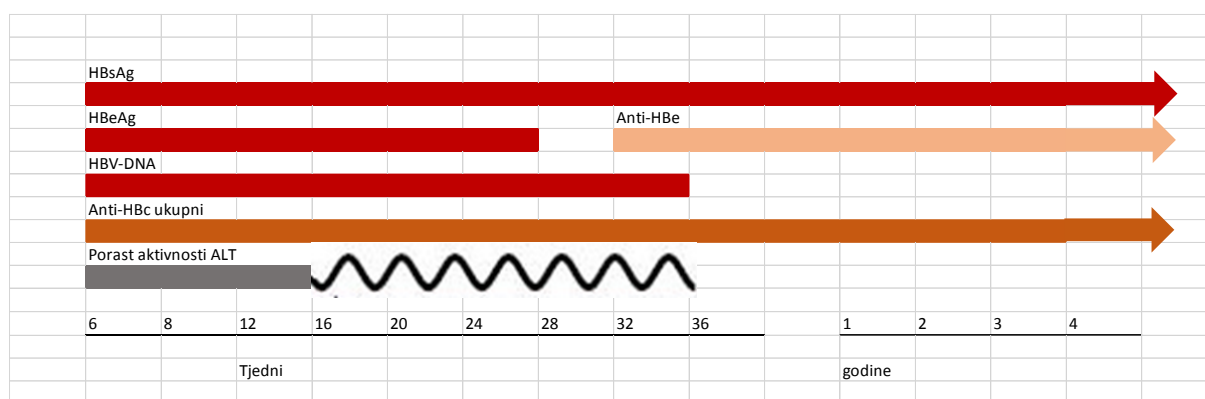
Dinamiku seroloških biljega u akutnom hepatitisu B karakterizira redoslijed njihove pojave u krvi i količina (titar), *slika 1.7*. HBV DNA može se dokazati 14 dana nakon infekcije, te za 10-tak dana HBsAg i HBeAg. Zaražena osoba počinje stvarati specifična protutijela, prvo usmjerena na HBcAg (IgM i IgG), potom na HBeAg i konačno 6 mjeseci nakon infekcije javljaju se HBsAg specifična protutijela, anti-HBs (Kao, 2008). Ponekad se zbog brzog klirensa HBsAg-a ne mogu detektirati anti-HBs nego samo anti-HBc IgM. Serokonverzija HBeAg/anti-HBe je prvi znak supresije replikacije i mogućeg izlječenja.



Slika 1.7. Dinamika biljega u akutnom hepatitisu B s oporavkom. Preuzeto i prilagođeno (uz dopuštenje nakladnika) iz Elgouhari i sur. 2008.

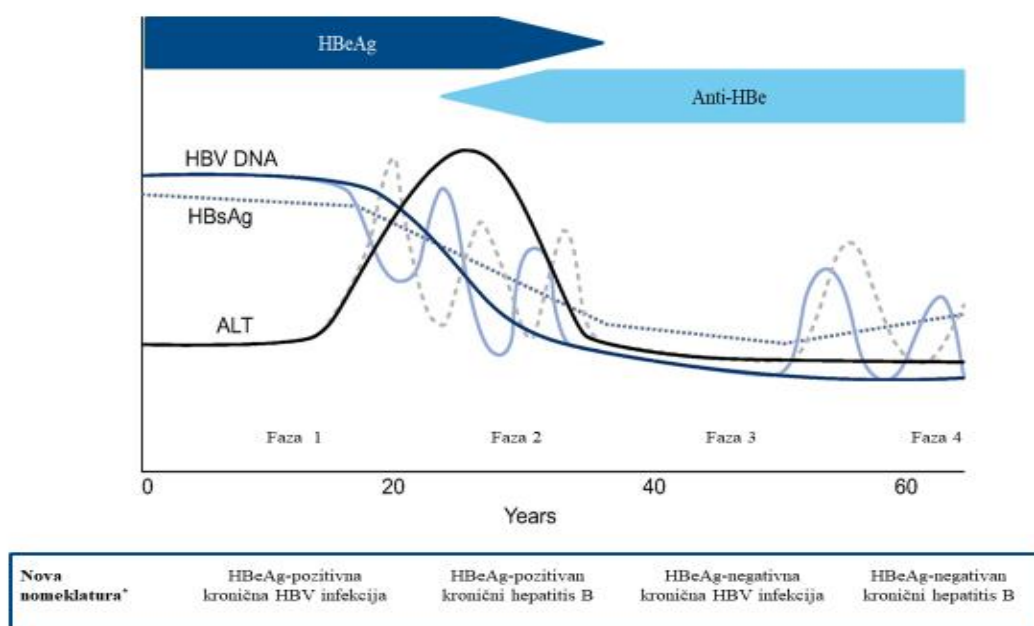
1.1.5.2. Kronični hepatitis B (KHB)

Manje od 5 % imunokompetentnih osoba inficiranih HBV-om razvit će KHB koji može biti simptomatski, asimptomatski i skriveni ili okultni (OBI). KHB infekciju definira pozitivan rezultat HBsAg-a duže od 6 mjeseci. Konstelacija HBV biljega u kroničnoj infekciji prikazana je na *slici 1.8*. U KHB aktivnosti jetrenih enzima variraju od normalnih do 5 puta povišenih vrijednosti. Trombocitopenija, hipoalbuminemija, hiperbilirubinemija i produženo protrombinsko vrijeme upućuju na cirozu.



Slika 1.8. Konstelacija HBV biljega u progresiji iz akutne u kroničnu HBV infekciju.
Preuzeto i prilagođeno (uz dopuštenje nakladnika) iz Elgouhari i sur. 2008.

U KHB razlikuje se nekoliko faza: faza imunotolerancije, faza imunološke eliminacije (imunoreaktivna HBeAg pozitivna), faza bez replikacije ili niske replikacije HBV-a te faza reaktivacije, prikazanih na *slici 1.9*. (Lok i sur., 2017). 2017. godine Europska udruga za studije bolesti jetre (EASL CPG HBV, 2017) prihvatila je novu podjelu KHB-a, prema kojoj je prirodni tijek kronične HBV infekcije podijeljen je u 5 faza, *tablica 1.1*. HBV biljezi za dijagnostiku su HBsAg, HBeAg/Anti-HBe i HBV DNA. Za procjenu jetrene bolesti preporučuju se sljedeći testovi: biokemijski parametar - ALT, biljeg fibroze – neinvazivni, elastogram ili biljeg, odnosno biopsija jetre u nekim slučajevima.



*Prema EASL CPG HBV, 2017.

Slika 1.9. Faze kronične HBV infekcije. Prema EASL CPG HBV, 2017.

Tablica 1.1. Prirodni tijek kronične HBV infekcije u 5 faza. Prema EASL CPG HBV 2017.

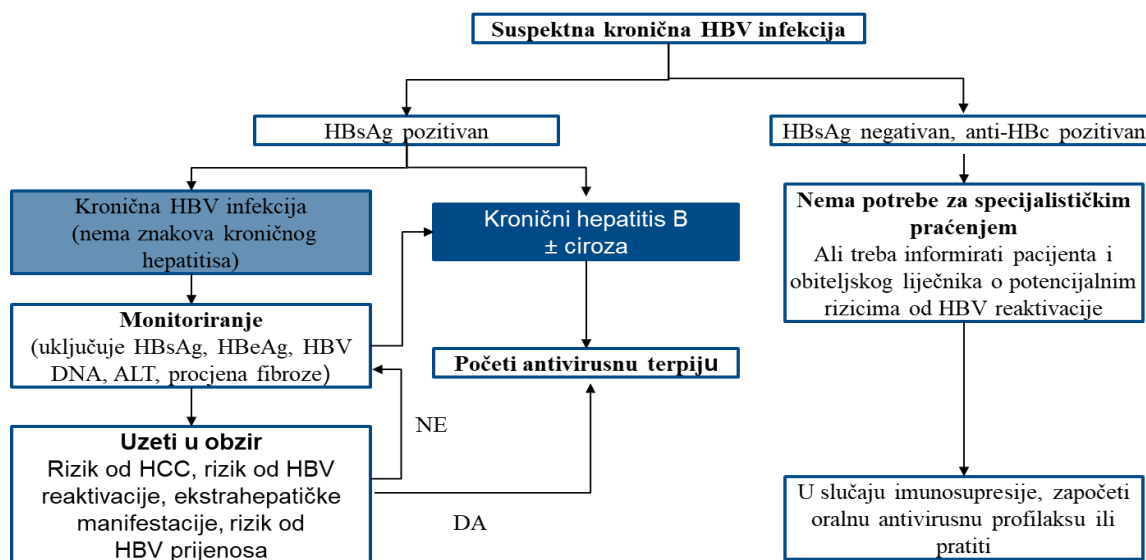
	HBeAg pozitivan		HBeAg negativan		
	Faza 1	Faza 2	Faza 3	Faza 4	Faza 5
	Kronična HBV infekcija	Kronični hepatitis B	Kronična HBV infekcija	Kronični hepatitis B	Razriješena HBV infekcija
HBsAg	Visoko	Visoko/umjereno	Nisko	Umjereno	Negativan
HBeAg	Pozitivan	Pozitivan	Negativan	Negativan	Negativan
HBV DNA	$>10^7$ IU/mL	10^4 – 10^7 IU/mL	$<2,000$ IU/mL*	$>2,000$ IU/mL	<10 IU/mL†
ALT	Normalno	Povišeno	Normalno	Povišeno†	Normalno
Jetrena bolest	Nema/minimalno	Umjereno/ozbiljno	Nema	Umjereno/ozbiljno	Nema§
Stara terminologija	Imunotolerantna	Imunoreaktivna HBeAg pozitivan	Inaktivni nosioc	HBeAg negativni kronični hepatitis	HBsAg negativan /anti-HBe pozitivan

* Koncentracija HBV DNA može biti od 2000 do 20.000 IU/mL u nekih pacijenata bez znakova kroničnog hepatitisa; † Perzistentno ili intermitentno, bazirano na tradicionalnoj gornjoj vrijednosti referentnog intervala (~40 IU/L); ‡ cccDNA može biti detektirana u jetri;

§ Rezidualni rizik od HCC-a postoji samo ako se ciroza razvila prije gubitka HBsAg-a

ALT: alanin-aminotransferaza; cccDNA: kovalentno zatvorena kružna DNA (od *engl.* covalently closed circular DNA); HBeAg: hepatitis B 'e' antigen; HBsAg: hepatitis B površinski antigen; HCC: hepatocelularni karcinom (od *engl.* HepatoCellular Carcinoma)

Prema istim europskim smjernicama, dan je i novi algoritam za razlikovanje i postupanje u kroničnom hepatitisu B, prikazan je na *slici 1.10*.



Slika 1.10. Algoritam za postupanje s kroničnim hepatitisom B. Preuzeto i prilagođeno (uz dopuštenje nakladnika) od EASL CPG HBV, 2017.

1.1.5.3. Okultni hepatitis B (OBI)

U doba osjetljivih tehnika za detekciju HBV DNA, značajan je udio pacijenata s pozitivnom HBV DNA, a bez detektabilnog HBsAg-a. OBI se definira kao prisutnost virusne DNA bez prisustva površinskoga antigena (HBsAg) u krvi izvan tzv. *window perioda* (WP) infekcije. Kod OBI-ja nisu nužno prisutna specifična protutijela na virusne antigene, ali 80 % pacijenata ih ima (seropozitivna OBI). HBV DNA može se dokazati u jetri, a u krvi je

uglavnom nedokaziva ili intermitentna (Raimondo i sur., 2008). VL je najčešće manji od 100, često i od 10 IU HBV DNA/mL.

O kliničkoj i virološkoj važnosti OBI-ja, dijagnozi i epidemiologiji, riziku od prijenosa transfuzijama krvnih pripravaka ili transplantacijama jetre, riziku od reaktivacije u stanjima supresije imunosnoga sustava, važnosti u progresiji u kronični hepatitis i mogućoj ulozi u razvoju hepatocelularnog karcinoma, raspravlja se od kasnih 1970.-tih godina. Molekulska baza OBI-ja je duga perzistencija virusne DNA u jezgri hepatocita nakon rekonvalescencije. Gotovo u svim slučajevima OBI-ja radi se o infekciji virusom kompetentnim za replikaciju, ali s jakom supresijom replikacije i ekspresije gena što rezultira značajno smanjenom količinom virusa. Kod manjeg broja osoba s OBI-jem prisutna je infekcija izazvana mutiranim HBV-om, a kao najčešće mutacije navode se mutacija u P genu ili S promotorskoj regiji virusne DNA koje uzrokuju smanjenu replikaciju virusne DNA ili sintezu S proteina (Raimondo i sur., 2008). Jedan od predloženih mehanizama razvoja OBI-ja je infekcija s HBV mutantima koji imaju neispravnu replikacijsku aktivnost ili neispravnu sintezu S proteina (Raimondo i sur., 2007). Drugo objašnjenje nastanka OBI-ja jesu infekcije s varijantama S gena, tzv. mutacije za dijagnostičko izbjegavanje (*engl.* diagnostic-escape) koje stvaraju modificirani HBsAg, a koji nije prepoznat dostupnim komercijalnim testovima. Klinička važnost OBI-ja povezana je s transfuzijama krvi jer su OBI infekcije u davatelja krvi najčešći uzrok prijenosa HBV-a transfuzijama krvnih pripravaka.

Prevalencija specifičnih mutacija povezanih s OBI-jem u pacijenata s OBI-jem je od 8,3 do 20,8 %, dok je u pacijenata s evidentnim hepatitisom samo 0 do 3,7 %. Također je nađeno da 20 mutacija uglavnom unutar 'a' determinante, ali i na ostalim dijelovima HBsAg-a, značajno korelira s OBI-jem u D genotipu (Y100S, Q101R, P105R, T115N, T116N, P120L, R122P, T123N, T126I, P127H/L, Q129P, M133T, Y134C, S143L, S167L, R169H, S174N, L175S, V177A) (Svicher i sur., 2012). Obzirom da su nađene mutacije potpuno drugačije od onih povezanih s OBI-jem u genotipu B i C (Yuan i sur., 2010), autori smatraju da su mutacije povezane s OBI-jem specifične za svaki HBV genotip.

OBI infekcije uglavnom su asimptomatske. Važno je otkriti OBI u davatelja krvi, organa i tkiva jer su rizični za prijenos HBV infekcije na imunokompromitirane primatelje (Gerlich i sur., 2010; Allain i sur., 2013). Najveća učestalost OBI-ja je u populacijama visokog rizika kao što su anti-HCV pozitivne osobe (30 %) i hemodijalizirani bolesnici (0 do 36 %) (Gutiérrez-García i sur., 2011). 20 % bolesnika s OBI-jem nemaju biljege HBV infekcije u krvi, 50 %

imaju samo anti-HBc (Torbensohn i Thomas, 2002), a 30 % biljege anti-HBc, anti-HBs i anti-HBe (Zerbini i sur., 2008). Ispitivanjem T staničnog odgovora u anti-HBc pozitivnih i negativnih bolesnika s OBI-jem pokazalo se da je u anti-HBc pozitivnih T stanični imuni odgovor istovjetan onom u razriješenoj HBV infekciji i uspostavljenoj imunoj kontroli. Međutim, taj odgovor nije dokazan u anti-HBc negativnih OBI slučajeva (Zerbini i sur., 2008). Jedno od mogućih objašnjenja je niska replikacija virusa i nedostatna količina HBcAg-a.

1.1.6. Prevencija hepatitisa B

Aktivna i pasivna imunoprofilaksa provodi se pored standardnih mjera sprječavanja širenja infekcije. 1992. godine WHO je donijela preporuku o uključivanju cijepljenja protiv hepatitisa B u nacionalne proširene programe cijepljenja do 1997. godine. Prema WHO Global Hepatitis Reportu, 2017, u 2015. godini 185 od 194 ili 95 % zemalja članica WHO je uvrstila cijepljenje u svoje programe. Između 1990. i 2015. godine cijepljenje djece je poraslo s 1 % na 84 %. Imunizacija po rođenju 2015. godine bila je globalno 39 % i to je najbolji način preveniranja vertikalnog puta prijenosa infekcije. Idealno je dozu cjepiva po porodu dati unutar 24 sata jer efekt cijepljenja pada s vremenom primjene doze cjepiva. U Americi i Zapadnom Pacifiku zastupljenost cijepljenja po porodu je u 2015. godini bila više od 70 %, dok je u Africi, koja je endemska za HBV infekciju, bila samo 10 %.

Cjepivo sadrži rekombinantni HBsAg, a rezultat je stvaranje neutralizirajućih anti-HBs protitijela na 'a' antigensku determinantu SHBsAg-a koja je konzervirani imunodominantni epitop za aktivaciju B limfocita. Prva doza mora obavezno biti aplicirana kao monocjepivo, dok se ostale doze mogu dati i u kombinaciji. Cjepivo se primjenjuje intramuskularno prema shemi 0, 1, 6 ili 0, 1, 4 ili 0, 2, 4 mjeseca. Imuni odgovor na prvu dozu u imunokompetentnih odraslih osoba je 30 do 55 %, na drugu 75 %, a na treću više od 95 %. Smanjeni odgovor na cijepljenje javlja se u pušača, pretjerano gojaznih ljudi i osoba s kroničnim bolestima (Alimonos i sur., 1998), ali i genetski čimbenici i imunosupresija imaju učinak na jačinu humoralnog odgovora. Imuni odgovor nakon cijepljenja je specifični B i T stanični odgovor u koji su uključene NK CD56+CD3- (od *engl.* Natural Killer) i NKT CD56+CD3+ (od *engl.* Natural Killer T) stanice, a osobe koje ne odgovore na cjepivo imaju nedostatan T stanični odgovor (Albarran i sur.,

2005). Danas se smatra da je nakon provedenog cijepljenja zaštita od HBV infekcije doživotna pa i kad titar anti-HBs protutijela padne ispod granice detekcije dijagnostičkog testa.

Pasivna imunizacija provodi se pripravljenim hepatitis B imuno-globulinom (HBIG) iz plazme s visokim koncentracijama anti-HBs-a i stvara kratkotrajnu zaštitu (3-6 mjeseci) protiv infekcije. Zajedno s cjepivom protiv hepatitisa B koristi se u imunoprofilaksi novorođenčadi HBsAg-pozitivnih majki (poželjno u roku 12 sati), i necijepljenih osoba koje imaju spolne kontakte s visokorizičnim ili HBsAg-pozitivnim osobama te nakon profesionalne ekspozicije s HBsAg-pozitivnom krvlju što prije, a najkasnije u roku 24 sata. Primjenjuje se kao zaštita nakon ekspozicije za poznate nereaktore na HBV cijepljenje.

1.1.7. Liječenje hepatitisa B

Prema EASL CPG HBV, 2017, liječenjem hepatitisa B treba osigurati duže preživljavanje i poboljšati kvalitetu života prevenirajući progresiju bolesti i HCC, zatim prevenciju prijenosa infekcije s majke na dijete, reaktivaciju infekcije te ekstrahepatičkih manifestacija KHB-a. Glavni cilj je dugotrajna supresija HBV DNA; optimalni cilj je gubitak HBsAg-a (i anti-HBs serokonverzija); vrijedan cilj je gubitak HBeAg-a i serokonverzija u anti-HBe u bolesnika s kroničnim HBeAg-pozitivnim hepatitisom B i dodatni cilj je biokemijski odgovor, odnosno normalizacija koncentracije ALT-a. Indikacije za liječenje temelje se na kombinaciji tri kriterija: HBV DNA, ALT i stupnju jetrene bolesti. Liječiti se moraju svi pacijenti s HBeAg-pozitivnim ili -negativnim KHB, pacijenti s cirozom i detektabilnom HBV DNA bez obzira na vrijednost ALT-a te pacijenti kojima je koncentracija HBV DNA viša od 20.000 IU/mL i koncentracija ALT-a dvostruko viša od normale bez obzira na stupanj tkivnog oštećenja.

Liječenje KHB-a provodi se s interferonom (INF) i analozima nukleoz(t)ida (*engl.* NUCleos(t)ide analogue, NUC). INF- α prirodni je citokin s imunomodulatornim antivirusnim djelovanjem. Liječenje se provodi s pegiliranim INF-om (PEG-INF) jer ima duže djelovanje (Craxi i Cooksley, 2003). *In vitro* i *in vivo* studije pokazale su da INF sprječava stvaranje pregenomske RNA koja kodira HBV kapside odnosno ubrzava njihovu degradaciju, stoga inhibira replikaciju HBV-a (Wieland i sur., 2000; Wieland i sur., 2005). INF- α posreduje pri represiji transkripcijske aktivnosti HBV cccDNA (Belloni i sur., 2012) zbog čega je redukcija

koncentracije HBsAg-a izrazita u pacijenata koji se liječe PEG-IFN-om. NUC lijekovi (lamivudine, tenofovir, telbivudine, adefovir, entecavir) inhibitori su virusne polimeraze i reverzne transkriptaze te učinkovito suprimiraju virusnu replikaciju HBV-a. Kako ne djeluju na cccDNA, slabo reduciraju koncentraciju HBeAg-a i HBsAg-a. Obzirom da monoterapija INF-om ili NUC-om nije dovoljna za eradikaciju kronične HBV infekcije, potencijalna strategija eradikacije je kombinacija tih lijekova (Wong i sur., 2014).

1.2. VIRUS HEPATITISA B

1.2.1. Otkriće HBV-a

Ispitujući protutijela na serumske lipoproteine u pacijenata koji su primili višestruke transfuzije krvi, npr. u pacijenata s talasemijom, američki biokemičar Baruch Samuel Blumberg i suradnici otkrili su 1965. godine lipoprotein koji je drugačiji od drugih i nazvali ga Australia antigen (AuAg) jer je serum bio od australskog aboridžina (Blumberg i Alter, 1965). 1968. godine Alfred Prince izolirao je antigen serumskog hepatitisa za koji se elektronskom mikroskopijom pretpostavljalo da se nalazi na česticama sličnim virusu (Prince, 1968). Nađeno je da su AuAg i serumski hepatitis antigen identični. Vremenom se AuAg prepoznao kao biljeg virusne infekcije HBV-om. Za svoje otkriće Blumberg je 1976. godine dobio Nobelovu nagradu u području medicine.

Dane i suradnici su 1970. godine opisali kompletnu HBV česticu od 42 nm koja je površinski sličila arbovirusima, ali je bila različita od prije opisanih virusa. Površina vanjskog omotača ove Dane čestice sadržavala je antigen identičan onome koji je formirao manje AuAg čestice (Dane i sur., 1970). 1973. godine WHO preimenovala je AuAg u hepatitis B antigen (HBAG) pa u HBsAg. Daljnja istraživanja pokazala su da su dvostruko omotane Dane čestice kompletni virion te da unutarnje sržne (*engl.* core) čestice, promjera od 27 nm, sadržavaju virusnu nukleinsku kiselinu i hepatitis B sržni antigen (HBcAg) (Almeida i sur., 1971). U približno isto vrijeme Magnius i Espmark otkrili su tehnikama imunodifuzije antigen različit od HBsAg-a, i to hepatitis B e antigen (HBeAg) te protutijela na HBeAg (anti-HBe) (Magnius i Espmark, 1972).

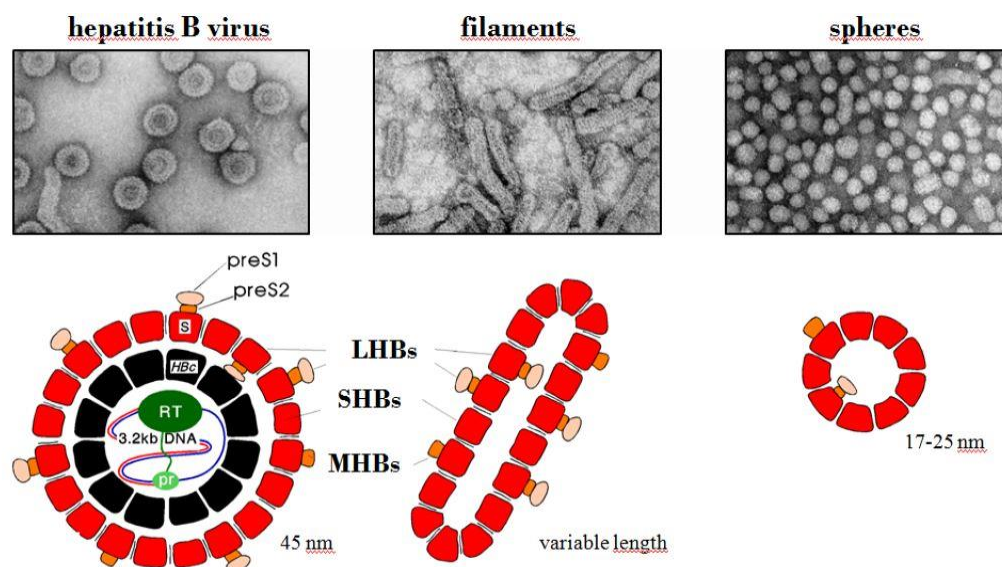
1.2.2. Klasifikacija HBV-a

Ljudski HBV pripada porodici *Hepadnaviridae*, odnosno hepadnavirusima sisavaca. To su DNA virusi s izrazitim tropizmom za jetru (od hepa: jetra; DNA: tip genoma). Porodici pripadaju dva roda virusa: *Orthohepadnavirusi* koji izazivaju hepatitis u čovjeka, primata i glodavaca, i *Avihepadnavirusi* koji izazivaju hepatitis u ptica (Seeger, 1991). HBV dijeli 80 % homolognosti s *Orthohepadnavirusima* i samo 40 % homolognosti s genomima virusa roda *Avihepadnavirusi*. Za razliku od retrovirusa, HBV DNA ne treba integraciju u genom domaćina da bi završila replikativni ciklus.

Hepadnaviridae karakterizira slijedeće: a) parcijalno dvolančana genomska DNA koja sadrži kompletan kodirajući lanac (negativni) i nekompletan nekodirajući lanac (pozitivni), b) RNA-ovisna DNA-polimeraza i replikacija preko pre-genomskog RNA predloška uz reverznu transkriptazu (Summers i Mason, 1982), c) visoka specifičnost za vrstu i tkivo te d) replikacija u diferenciranim stanicama jetre (u citoplazmi) i ne pokazuju citopatogeničnost (Chisari i Ferrari, 1995). Tipično svojstvo inficiranih stanica s *Hepadnaviridae* je sinteza i sekrecija viriona te visoka količina subvirusnih čestica (Ganem, 1991).

1.2.3. Struktura i morfologija HBV-a

HBV je DNA virus, promjera od oko 42-47 nm. Virioni su karakteristično dvostruko omotni, *slika 1.11*, a sadrže virusni omotač i ikosaedralnu nukleokapsidu, srž. Virusna polimeraza veže se za virusnu DNA kao i protein kinaza iz stanice domaćina. Kompleks je okružen nukleokapsidom, HBc, promjera 32-34 nm (Almeida i sur., 1971). Srž HBV-a sastoji se od 180 ili 240 sržnih proteinskih podjedinica (HBcAg) koje tvore dimere, a koji formiraju ikosaedron s T3 (180 podjedinica) ili T4 (240 podjedinica) simetrijom (Crowther i sur., 1994; Kenney i sur., 1995). Nukleokapsida je omotana lipidnom membranom u koju su ugrađena tri površinska proteina: veliki (*engl.* Large, LHBs) (39 kDa, 42 kDa), srednji (*engl.* Middle, MHBs) (31 kDa) i mali (*engl.* Small, SHBs) (24 kDa). Ta tri proteina tvore površinski (*engl.* surface) hepatitis B antigen, HBsAg. U usporedbi s količinom kapside, HBsAg se stvara u suvišku (Ganem, 1991) što dovodi do stvaranja filamentoznih i sferičnih struktura koje ne sadrže virusnu DNA pa nisu infektivne.



Slika 1.11. Struktura HBV-a i subvirusnih čestica. A) Slike viriona dobivene elektronskim mikroskopom s negativnim kontrastom (lijevo), filamenti (u sredini) i sferični oblici (desno). B) Virioni (lijevo) i subvirusne čestice (u sredini i desno) prekriveni su s HBsAg koji se sastoji od S-domene (crveno), preS2-domene (narančasto) i preS1-domene (roza). Virioni dodatno sadržavaju virusnu kapsidu, (HBc, crno) i virusnu polimerazu (crvene i plave linije) povezane s reverznom transkriptazom (RT, tamno zeleno) i primerom (pr, svjetlo zeleno). Modificirano prema Gerlich 2013.

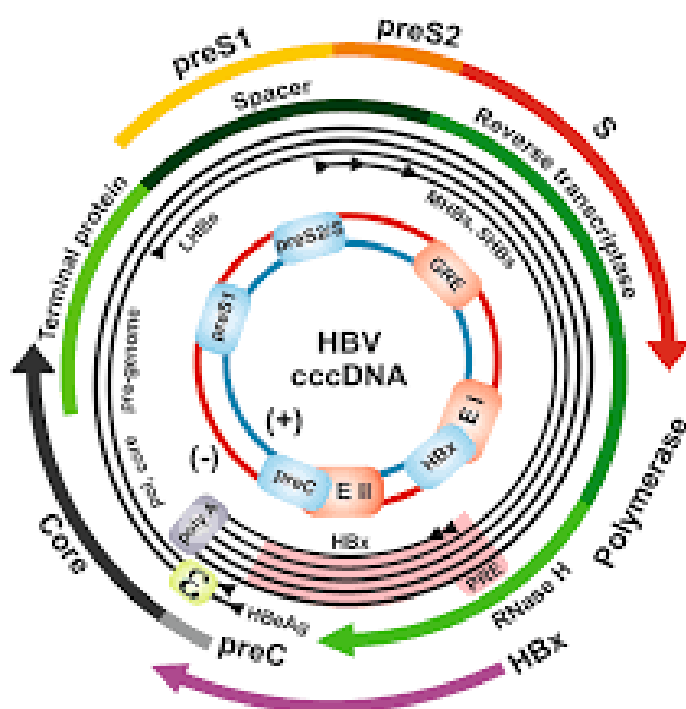
Preuzeto (uz dopuštenje autorice) iz: Christina Mohr. Influence of Hepatitis B Virus Surface Protein Variants Associated with Antiviral Resistance on Viral Assembly and Secretion of Hepatitis B and Hepatitis D Viruses. Angefertigt am Institut für Medizinische Virologie Nationales Referenzzentrum für Hepatitis-B- und D-Viren der Justus-Liebig-Universität Gießen. Dostupno na: <https://docplayer.net/1067617-Angefertigt-am-institut-fur-medizinische-virologie-nationales-referenzzentrum-fur-hepatitis-b-und-d-viren-der-justus-liebig-universitat-giessen.html>.

1.2.4. Genomska struktura

HBV genom, *slika 1.12*, je dužine od oko 3200 parova baza – jedna molekula djelomice jednolančane i djelomice dvolančane (ds) DNA, a kraći od ljudskih virusnih patogena je jedino RNA genom virusa hepatitisa D, s oko 1600 nukleotida (nt). Genom sadrži dugi negativni-DNA lanac, koji ima definirani 5' i 3' kraj dužine od 3182 do 3248 nt, ovisno o genotipu (Summers i sur., 1975), i kraći pozitivni-DNA lanac varijabilne dužine. Krajevi negativnog lanca nisu zatvoreni nego imaju kratko ponavljanje od 8 do 10 nt na što se kovalentno veže primer virusne polimeraze (Gerlich i Robinson, 1980; Bartenschlager i Schaller, 1988). Virusna DNA sadrži kratka mjesta s tripleks formacijama u regiji gdje se kratka ponavljanja negativnog lanca premošćuju pozitivnim (Will i sur., 1987). Cirkularna struktura DNA uzrokovana je sparivanjem baza oba lanca. Komplementaran pozitivni lanac ne kodira virusne proteine pa se niti ne transkribira. Nekompletan pozitivni lanac ima definiran 5' kraj i varijabilan 3' kraj (1100-2600 nt ukupno), ovisno o tome koliko daleko virusna polimeraza može sintetizirati pozitivan lanac prije nego se virus izluči (Hruska i sur., 1977; Landers i sur., 1977). Virusni genom ima dva izravna ponavljanja (DR1 and DR2) (Dejean i sur., 1984) koji imaju važnu ulogu za vrijeme virusne replikacije (Siddiqui i sur., 1979; Will i sur., 1987). Negativni lanac kodira četiri otvorena okvira za čitanje (*engl.* Open Reading Frames, ORFs) (Schlicht i Schaller, 1989) koji se razlikuju u dužini (Tiollais i sur., 1985) i kodiraju sve virusne proteine: **a) S-ORF** ima tri startna kodona, preS1, preS2 i S, sa zajedničkim C-, a različitim N- krajevima, a postranslacijski daje 3 proteina koji se razlikuju u broju aminokiselina: LHBs, MHBs, SHBsAg (Heermann i sur., 1984), **b) C-ORF** ima na 5' kraju produžetak PreC. Gen sadrži dva startna kodona za translaciju dva različita proteina, HBeAg i HBcAg. HBeAg je sekretoran i razlikuje se strukturno od HBcAg koji je protein nukleokapside, **c) POL-ORF** je kodirajuća regija za virusnu polimerazu koja djeluje kao početni protein vezan za genom, a ima funkciju DNA polimeraze, reverzne transkriptaze i RNaze H (80 % dužine genoma), **d) X-ORF** odgovoran je za translaciju u X protein s mnogobrojnim funkcijama među kojima važna u karcinogenezi i replikaciji virusa.

Ekspresiju ORF-a reguliraju četiri promotora (preC/C, preS1, preS2/2, X), dva pojačivača, element odgovoran za glukokortikoide (*engl.* Glucocorticoid-Responsive Element, GRE) koji pojačava transkripciju te negativni regulatorni element (*engl.* negative regulating element, NRE) i CCAAT koji reguliraju transkripciju mRNA (Tang i sur., 2001). Jetreni čimbenici te čimbenici vezani za diferencijaciju vežu se za pojačivač što dovodi do specifične

transkripcije i replikacije u hepatocitima (Glebe, 2006). Završetak transkripcije reguliran je poliadenilacijskim signalnim motivom i sadrži kodone UAUAAA te tako svaka mRNA ima isti 3' kraj (Ganem i Varmus, 1987). Posttranskripcijski regulatorni element (*engl.* Posttranscriptional Regulation Element, PRE), smješten na 3' kraju između 1200 i 1650 nt HBV genoma, suprimira izrezivanje transkribiranih virusnih mRNA i omogućuje njihov transport iz nukleusa u citoplazmu (Huang i Liang, 1993). Enkapsidacijski signal ϵ na 5' kraju pregenomske mRNA (Junker-Niepmann i sur., 1990) u kombinaciji s virusnom polimerazom, koja pomaže uklopiti pregenomsku mRNA u novonastalu nukleokapsidu da bi se prepisala u DNA, važan je za enkapsidaciju virusa (Hirsch i sur., 1990; Bartenschlager i Schaller, 1992).



Slika 1.12. Struktura genoma HBV-a. Četiri ORF-a sa svojim proteinima: Core-ORF (crno), S-ORF (od žute do crvene boje): preS1-domena (žuto), pre-S2 domena (narančasto) i S-domena (crveno). Virusna polimeraza je u zelenoj boji: terminalni protein (svjetlo zeleno), spacer domena (jako tamno zeleno), reverzna transkriptaza (tamno zeleno) i RNaza H domena (svjetlo zeleno). Crne linije predstavljaju različite transkribirane mRNA za virusne proteine s polyA krajem i ϵ -signalnom sekvencom. mRNA su opisane izvana prema unutra: X-protein, MHBs i SHBs, LHBs, pregenomska (pg) RNA i HBeAg. Dva ciklusa u sredini predstavljaju cccDNA lance s negativnom (plavo) i pozitivnom (crveno) polarnošću uključujući njihove promotore

(jasno plavo) i pojačivače (boja marelice). *E*: pojačivač (engl. *enhancer*), *GRE*: element odgovoran za glukokortikoide (od engl. *Glucocorticoid-Response-element*), ϵ : epsilon enkapsidacijski signal. Preuzeto (uz dopuštenje nakladnika) od Glebe i Bremer, 2013.

1.2.5. Virusni proteini

1.2.5.1. Strukturni proteini

1.2.5.1.1. Sržni (engl. *core*) proteini

Translacijski produkti C gena, koji ima 549-559 nt, sržni su proteini. C gen se nastavlja s 87 nukleotida u preC regiji, a ove nukleotide dijele dva startna kodona AUG. Počevši na drugom startnom kodonu, sintetizira se primarni translacijski produkt HBV-a od 21,5 kDa, sržni protein (HBcAg). Sadrži 183 ili 185 aminokiselina (ak), ovisno o genotipu. Sržni protein formira dimer od prvih 140 ak te se njihovom daljnjom formacijom stvaraju heksameri koji su osnovna građevna jedinica nukleokapside. Brzina stvaranja nukleokapside ovisi o koncentraciji proteina i RNA, a nastaju dominantne nukleokapside s oko 240 sržnih proteina (T=4 simetrija, 80-90%) i one od 180 sržnih proteina (T=3) (Wynne i sur., 1999). Obje se simetrije nalaze u virionu i nije poznata funkcionalna razlika. HBc protein se fosforilacijom tijekom sazrijevanja nukleokapside stabilizira te tako pojača afinitet za DNA, što je važno jer se transkripcija pregenomske RNA u genomsku DNA odvija u nukleokapsidi. HBc protein nosi signal za ulazak u jezgru hepatocita. Sržni protein se veže za kovalentno zatvorenu cirkularnu DNA (engl. *covalently closed circular DNA*, cccDNA), kako bi regulirao razmještanje nukleosoma na cccDNA. cccDNA, smještena u jezgri, replikacijski je međuprodukt hepadna virusa koja formira minikromosome (Bock i sur., 2001).

Počevši od prvog startnog kodona, sintetizira se translacijski produkt od 29 ak koji je signalna sekvenca s funkcijom usmjeravanja preC proteinskog produkta, Mr 25 kDa, prema endoplazmatskom retikulu (ER) zbog sekrecije. U ER-u enzimskim kidanjem nastaje konačni protein, HBeAg, Mr 15-18 kDa (Wang i sur., 1991). HBeAg nije strukturni protein HBV-a i nema učinak na HBV morfogenezu i infektivnost, ali je imunogen i bez učinka na otpuštanje

citokina. Nađena je povezanost HBeAg i razvoja imunotolerancije kod novorođenčadi od majki zaraženih s HBV-om (Hadziyannis i sur., 1983; Milich i Liang, 2003).

1.2.5.1.2. HBV polimeraza

Drugi protein translatiran od pregenomske RNA, P gena, je virusna polimeraza (Mr 90 kDa), poznata i kao P protein, koja se sastoji od 845 ak. Ovaj protein ima 4 domene: prva i druga domena su primaza i razdjelnik bez poznatih funkcija, treća je RNA- i DNA-ovisna polimeraza (40 % gena) te četvrta domena je enzim RNaza H koja miče RNA istodobno s elongacijom negativnog DNA lanca.

1.2.5.2. Površinski proteini

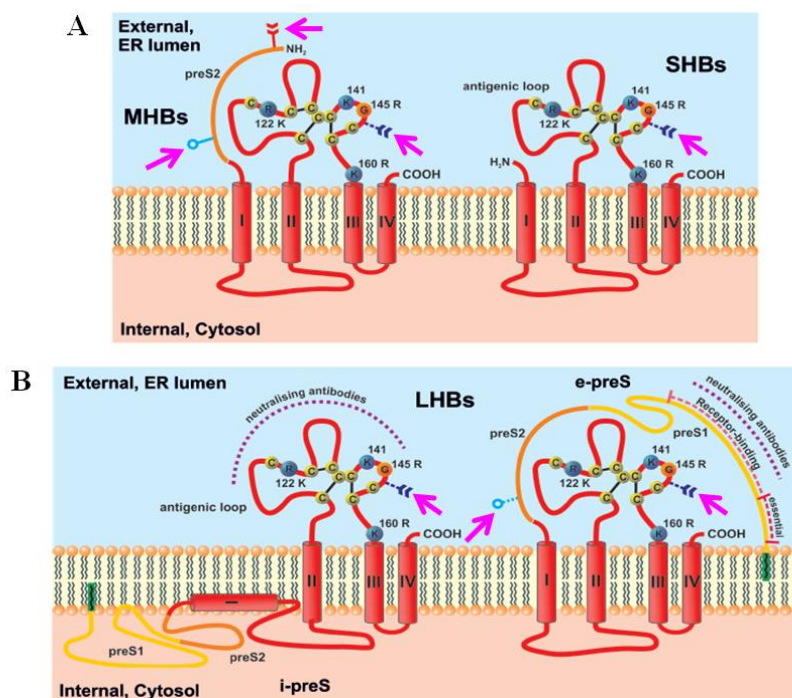
Tri različita površinska proteina, pod zajedničkim nazivom HBsAg, ugrađena su u lipidnu membranu koja okružuje virione i subvirusne česice hepatitisa B (Almeida i sur., 1971). Kodira ih S gen koji ima tri domene: preS1, preS2 i S. SHBs sadrži 226 ak (S domena), a javlja se kao neglikozilirana forma (p24) i glikozilirana forma (gp27). MHBs sadrži 226 ak (SHBs) na C-kraju + 55 ak (preS2) na N-kraju, gp33 i gp36. LHBs sadrži 226 ak (SHBs) + 55 ak (MHBs) + 119 ak (preS1), gp39 i gp42 (Ganem i Varmus, 1987; Lau i Wright, 1993; Milich i sur., 1985; Heermann i sur., 1984). Obzirom da koriste varijabilne inicijacijske kodone, proteini dijele jednake C-terminuse, odnosno isti stop kodon, ali imaju različit N-terminalni kraj (Heermann i sur., 1984). Također imaju i različit glikozilacijski status (Schmitt i sur., 1999). Pa tako N-glikozilacija počinje ko-translacijski u ER-u, (Gavilanes i sur., 1982), dok se O-glikozilacija odvija post-translacijski u Golgijevom aparatu (GA) za vrijeme sekrecije (Patzner i sur., 1986; Huovila i sur., 1992).

S-HBsAg je najmanji HBV površinski protein, koji se sastoji samo od S-domene, Mr 24 do 27. Javlja se i kao sferična i kao filamentozna čestica u krvi i drugim tjelesnim tekućinama i sekretima. Njegova sekvenca se nalazi i u MHBs-u i u LHBs-u. SHBs je najveća komponenta HBsAg-a, oko 85 %, s esencijalnim ulogama u morfogenezi, stvaranju viriona i sekreciji (Bruss i sur., 1994). SHBs ima najmanje 2, a vjerojatno 4, transmembranske hidrofobne spirale (Berting i sur., 2000). Cistinski mostovi na pozicijama 107 i 138, 137 i 149 dovode do stvaranja

unutarnje (ak 28 do 79) i vanjske omče (ak 99 do 161), prikazano na *slici 1.13*. Kraća linerana sekvenca unutarnje omče povezana je sa stvaranjem viriona i posreduje u vezanju zrele nukleokapside (Bruss, 1997). Unutarnja omča sadržava važnu imunogenu HBsAg determinantu poznatu kao 'a' determinanta (ak 124-147), a na temelju koje se razlikuju genotipovi i subtipovi HBV-a. Na poziciji asparagin-146 (Asn-146) antigenska petlja sadržava N-glikozilacijsko mjesto (Peterson, 1981). Mutacije SHBs-a koje se javljaju za vrijeme antivirusne terapije HBV-a, mogu dovesti do tzv. *S-escape* varijanti (Cooreman i sur., 2001; Locarnini, 2005).

M-HBsAg sastoji se od S-domene te dodatka od 55 ak na dugom N-terminalnom kraju (preS2 domena), Mr 33 do 36. Za vrijeme sinteze preS2 domena se translocira u lumen ER-a i N-glikozilira se na poziciji asparagin (Asn)-4 (Stibbe i Gerlich, 1982) te se dalje u GA-u O-glikozilira na poziciji treonina (Thr)-37 u svim genotipovima, osim genotipu A (Schmitt i sur., 1999). Obzirom da su svi S proteini potencijalno glikozilirani na poziciji Asn-146 u S-domeni, druga glikozilacija u preS2-domeni na poziciji Asn-4, samo u MHBs, ali ne i u LHBs (Heermann i sur., 1984), važna je za sekreciju virusa pa je potencijalna meta antivirusne terapije N-glikan MHBs (Schmitt i sur., 1999).

L-HBsAg najveći je površinski HBV protein, Mr 39 do 42, i obuhvaća S-domen, preS2-domen i preS1-domen, s dodatnih 108, 118 ili 119 ak, ovisno o genotipu. L-HBsAg je varijabilne dužine i nema glikozilacijskih pozicija, ali posjeduje miristilacijski signal važan za infektivnost HBV-a. Pojavljuje se u dvije topologije, interno lociran u lumenu viriona ili eksterno eksponiran na površini virusa (Bruss i sur., 1994). PreS1-konformacija na površini virusa važna je za vezanje za hepatocyte preko potencijalnog receptora (NTCP) i time posreduje ulasku virusa i infekciji (Yan i sur., 2012). U kombinaciji s unutarnjom omčom SHBsAg-a (ak 28 do 79), interna preS1-konformacija je važna za vezanje virusnog omotača sa zrelom nukleokapsidom koja sadržava virusni genom (Bruss, 1997). L-HBsAg sadrži acetilacijsko mjesto na poziciji glicin (Gly)-2 s mistrinskom kiselinom na N- kraju (Persing i sur., 1987). Ta mistrilacija zajedno s preS1-domenom, posreduje vezanju HBV-a za hepatocyte.



Slika 1.13. Hipotetska membranska topologija HBsAg-a. A) MHBsAg i SHBsAg sa svoje 4 transmembranske domene (crveno). SHBsAg sadrži antigensku petlju (između transmembranske domene II i IV) uključujući 8 konzerviranih cisteina povezanih disulfidnim vezama (žute povezane točke). B) Model LHBsAg topologije. LHBsAg s internom izoformom (i-preS) i eksternom izoformom (e-preS). Kod i-preS izoforme, antigenska petlja je s vanjske strane i to je vezno mjesto za vezanje neutralizirajućih protutijela (ljubičasta točkasta crta). Kod e-preS izoforme, preS1-domena prezentira svoje vezno mjesto za receptore (crvena točkasta crta). Žute, plave i ljubičaste strelice te prstenovi koji označavaju glikozilacijska mjesta su dodatno naznačeni ružičastom strelicom. Plava pozadina znači vanjsku stranu virusa kao i ER-lumen. Roza pozadina označava unutarnju stranu virusa ili citosol stanice. Preuzeto (uz dopuštenje nakladnika) od Glebe i Bremer, 2013.

1.2.5.3. Nestrukturni proteini

1.2.5.3.1. HBeAg (opisan u poglavlju 1.2.5.1.1.)

1.2.5.3.2. HBx protein

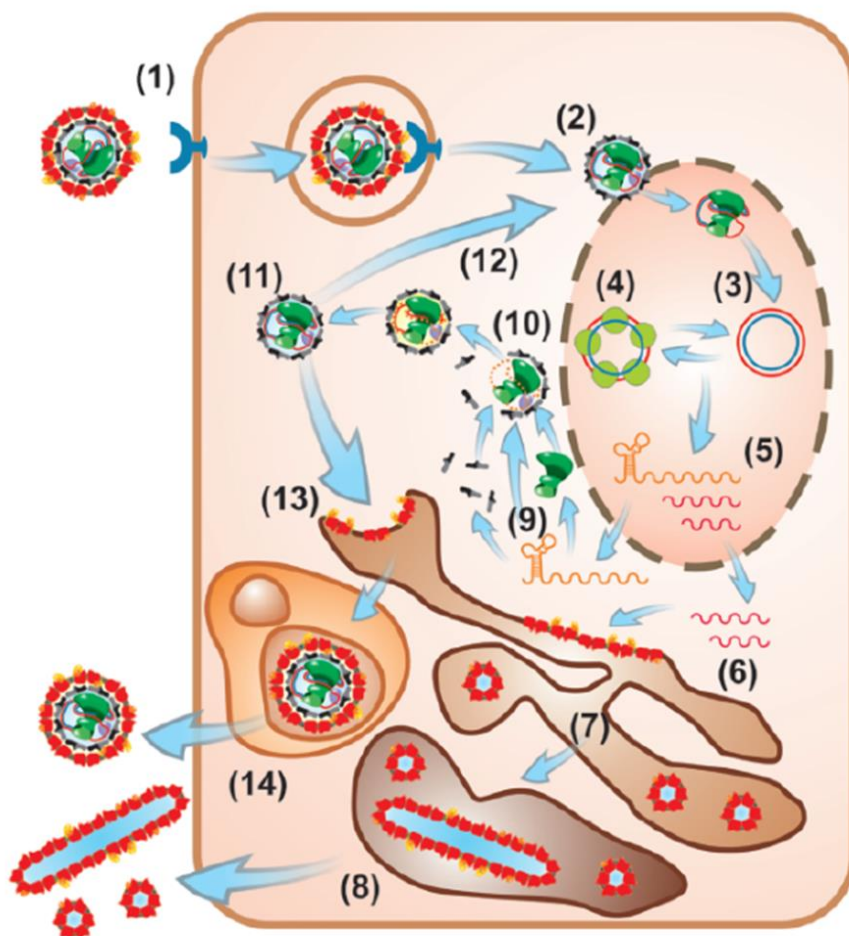
HBx protein, Mr 17, sadrži 154 ak. Nastaje translacijom 0,9 kb RNA transkripta. Trenutne spoznaje pokazuju da HBx protein ima ulogu u patogenezi HCC induciranog HBV-om. HBx gen je obično uključen i ostaje funkcionalno aktivan u HBV DNA koja je integrirana u staničnu DNA za vrijeme hepatocelularne karcinogeneze. HBx protein promiče progresiju staničnog ciklusa, inaktivira negativne regulatore rasta i veže se i inhibira ekspresiju p53 tumorskih supresorskih gena i ostalih tumorskih supresorskih gena i čimbenika vezanih za starenje (Kew, 2011).

1.2.6. Replikacija virusa

Virusni ciklus prikazan je na slici 1.14. Nakon infekcije, HBV cirkulira u krvi i prolazi kroz male pore na jetrenom endotelu i dolazi u Disseov prostor. U početku je afinitet vezanja HBV-a za hepatocyte nizak i posredovan je heparan-sulfat proteoglikanima (HSPG) (Schulze i sur., 2007; Leistner i sur., 2008). Nađeno je da je funkcionalni receptor za HBV i HDV natrij taurokolat kotransportni polipeptid (*engl.* sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide, NTCP) (Yan i sur., 2012). Vezanje HBV-a za NTCP posredovano je preS1 regijom LHBs-a, i to ak 9 do 18 (esencijalno) i ak 29 do 48 (dodatno) te N-terminalna mistrinska kiselina (Neurath i sur., 1986a; Le Seyec i sur., 1998; Glebe i sur., 2005; Engelke i sur., 2006; Leistner i sur., 2008), i druga vezujuća regija S-domene je vjerojatno potrebna za ulazak viriona i fuziju (Glebe i sur., 2005; Jaoudé i Sureau, 2005).

Nakon vezanja, HBV ulazi nepoznatim endocitotičnim mehanizmom, kada dolazi do fuzije virusne i stanične membrane. Virusna kapsida se odmotava i aktivno transpotira u NPC (od *engl.* Nuclear Pore Complex) (Rabe i sur., 2006). U NPC-u nukleokapsida se veže preko α/β -importina za nuklearnu mrežu i transportira u karioplazmu (Kann i sur., 1999; Rabe i sur., 2003). Unutar karioplazme relaksirana kružna DNA završava kao cccDNA uz staničnu DNA-polimerazu (Köck i Schlicht, 1993). Tada cccDNA s histonima stvara minikromosome, uz

staničnu DNA (Block i sur., 1994; Newbold i sur., 1995). Stvaranje cccDNA je prvi biljeg infekcije. cccDNA ima dugačko poluvrijeme života, iako nije integrirana u stanični genom i djeluje kao najveći virusni transkripcijski kalup (Bock i sur., 2001). Nakon stvaranja cccDNA, počinje transkripcija negativnog lanca, i to transkripcija nekoliko mRNA (pregenomske, pg, i subgenomske RNA) (Rall i sur., 1983) inducirane staničnom polimerazom II, uzvodno od DR1. Nakon ulaska u jezgru, pg-mRNA se translatira u virusnu polimerazu (pol) i HBV sržni protein (HBcAg) te služi kao kalup za reverznu transkripciju. Nakon stvaranja kompleksa sa staničnim šaperonima (Hsp 90 i Hsp 23; od *engl.* Heat-shock protein, Hsp) (Hu i Seeger, 1996; Hu i sur., 1997), virusna polimeraza se veže za ϵ -signal na 5'-kraju pg-mRNA (Junker-Niepmann i sur., 1990; Bartenschlager i Schaller, 1992). Kada se sintetizira dovoljna količina virusnih proteina, spontano se stvara sržna kapsida (Seifer i Standring, 1993). Sržni proteini okružuju kompleks pg-mRNA-polimeraza-šaperon u nezrele čestice u citosolu stanice (Bartenschlager i Schaller, 1992; Hu i Seeger, 1996). Tako stvorena pg-mRNA služi kao kalup za reverznu transkripciju preko domene reverzne transkriptaze na virusnoj polimerazi (Summers i Mason, 1982). U nukleokapsidi se također sintetizira pozitivni lanac uz DNA-ovisnu-DNA-polimeraznu aktivnost virusne polimeraze (Lien i sur., 1986; Seeger i Maragos, 1989). Sada zrela sržna čestica može ponovo migrirati u jezgru za akumulaciju cccDNA (Tuttleman i sur., 1986) ili može stupiti u interakciju s membranama koje sadrže HBsAg u ER-u za omotavanje (Miller i sur., 1984; Gerelsaikhani i sur., 1996). Ostala virusna mRNA se također eksportira u citoplazmu i transkribira u HBsAg (2,4 i 2,1 kb) i X-protein (Kaneko i Miller, 1988). Omotani virioni pupaju i izlučuju se preko multivezikularnih tijela (*engl.* Multi Vesicular Bodies, MVB) (Lambert i sur., 2007). Za razliku od toga, do formiranja subvirusnih čestica može doći autonomno u ER-u. Njihova sekrecija je istim putem preko ER-a i GA-a (Gavilanes i sur., 1982; Patzer i sur., 1986; Huovila i sur., 1992).



Slika 1.14. Shematski prikaz virusnog životnog ciklusa. (1) Vezanje i ulaz preko receptora NTCP, (2) oslobađanje virusne DNA u karioplazmu, (3) stvaranja cccDNA, (4) kompleks sa staničnim histonima, (5) transkripcija pgRNA i mRNA za LHBs i MHBs/SHBs, (6) transport mRNA u citoplazmu, (7,8) formiranje i sekrecija subvirusnih čestica preko ER-a i GA, (9) translacija pgRNA u sržne proteine, (10) organiziranje viriona, (11) sazrijevanje genoma, (12) retransport zrelih sržnih kapsida u jezgru, (13,14) omotavanje i sekrecija viriona preko MVB-a. Preuzeto (uz dopuštenje nakladnika) od Glebe i Bremer, 2013.

1.2.7. Mutacije virusa

HBV je najvarijabilniji DNA virus, uglavnom zbog jedinstvenog životnog ciklusa koji uključuje aktivnost enzima sklonog greškama, reverzne transkriptaze, i stvaranje velikog broja viriona po danu (10^{12} virusa/dan) (Nowak i sur., 1996). U zadnja dva desetljeća brojna istraživanja pokazala su da genetička varijabilnost virusa utječe na brzinu progresije bolesti, pouzdanost diagnostičkih metoda, uspjeh antivirusne terapije i imunizacije.

Poznate HBV mutacije prikazane su u *tablici 1.2.* (Lazarević, 2014). Najčešće mutacije su mutacije HBsAg-a. HBsAg služi za vezanje s hepatocitima te je glavni epitop za neutralizacijska protutijela. Središnji dio HBsAg-a, ak 99 do 169, koji je najveća hidrofilna regija (*engl.* Major Hydrophilic Region, MHR), ispoljava se na površini i veže se za anti-HBs. Protutijela nađena u cijepljenih osoba i u imunotestovima za detekciju HBsAg-a usmjerena su na ovu regiju, odnosno klaster epitopa za B stanice nazvanom 'a' determinanta, koja ima dvije omče, ak 124 do 147 (Kay i Zoulim, 2007). Mutacije u 'a' determinanti dovode do lažno negativnih rezultata testiranja u nekim komercijalnim testovima za HBsAg, do nezadovoljavajućeg odgovora na anti-HBV imunoglobulinsku terapiju te neodgovarajućeg odgovora na cijepljenje. Točkasta mutacija zamjene glicina s argininom na poziciji 145 (G145R) je najrasprostranjenija mutacija izbjegavanja odgovora na cjepivo.

Tablica 1.2. Hepatitis B virusne mutacije i njihove kliničke implikacije. Preuzeto i prilagođeno iz Lazarević, 2014.

Vrsta mutacije	Kliničke implikacije	Mutacije
HBsAg mutacije	Izbjegavanje cjepiva	T116N, P120S/E, I/T126A/N/I/S, Q129H/R, M133L, K141E, P142S, D144A/E, G145R/A
	OBI	Y100S, Q101R, P105R, T115N, T116N, G119R, P120L, R122P, T123N, C124R/Y, T126I/S, P127H/L, Q129P/R, M133T, Y134C, S136P, C139R, T140I, K141E, S143L, D144A, G145R/A, S167L, R169H, S174N, L175S, V177A, Q181STOP

Mutacije bazalnog sržnog promotora/ precore mutacije	HBeAg-negativni hepatitis	T1753C, A1762T, G1764A, C1766T, T1768A, G1896A, G1899A
	HCC	T1753C, A1762T, G1764A, C1766T, T1768A, G1896A, G1899A
	Fulminantni hepatitis	A1762T, G1764A, G1862T, G1896A
Mutacije X gena	HCC	3'-HBx delecije
Mutacije povezane s rezistencijom na lijekove	LAM/L-dT rezistencija	rtL80V/I, rtI169T, rtV173L, rtL180M, rtA181T/V, rtT184S/G, rtS202I, rtM204V/I, rtQ215S
	ADF-rezistencija	rtA181T/V, rtI233V, rtN236T
	ETV-rezistencija	rtL180M, rtT184G/S, rtS202I/G, rtM204V, rtM250V
	TDF-rezistencija	rtP177G, rtA194T, rtF249A

HCC: hepatocelularni karcinom; OBI: okultna hepatitis B infekcija; LAM: Lamivudine; L-dT: Telbivudin; ADF: Adefovir; ETV: Entecavir; TDF: Tenofovir

1.3. LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA VIRUSNOG HEPATITISA B

Prva generacija testova u dokazivanju HBsAg-a, a koju je koristio Blumberg, bila je imunodifuzija na agaroznom gelu prema Ouchterlony-ju. Ova metoda imala je visoku specifičnost i slabiju osjetljivost, a inačica ove metode - protusmjerna imunoelektroforeza korištena u testiranju davatelja krvi nije u potpunosti prevenirala post-transfuzijski hepatitis B. Stoga je difuzija na agaroznom gelu bila trenutno rješenje za detekciju AuAg-a. 1972. godine tim biokemičara Lacy Overby, Ghung-Mei Ling i Richard Decker, iz Abbott Laboratories, razvio je novi princip testiranja za visoko osjetljivu detekciju antigena i protutijela, sendvič radioimunotest na čvrstoj fazi, nazvan Ausria 125 ($125=I^{125}$) (Ling i Overby, 1972). Test je koristio specifičnost biološke interakcije antigen – protutijelo s visokom osjetljivošću te

moderne fizikalno-kemijske analitičke metode. Proteini se mogu kovalentno vezati na mnoge fizikalno detektabilne komponente.

Obzirom da nije bilo tkivne kulture za viruse, pa i HBV, novi test (radioimuno test; *engl.* Radio Immuno Assay, RIA) koristio je obilježavanje antigena ili protutijela radioaktivnim jodom-125 (J-125), koji se već koristio za određivanje inzulina ili malih molekula. Test je koristio potpuno novi princip vezanja jedne komponente, odnosno anti-HBs-a, adsorpcijom za površinu (čvrstu fazu) te zatim omogućavanje specifičnog vezanja analita iz seruma pacijenta, HBsAg-a, za površinu (anti-HBs). Obzirom da HBsAg čestice sadrže oko 100 veznih mjesta za protutijela, bilo je moguće da se HBsAg prvo veže za čvrstu fazu, i u drugom koraku, za mnoge molekule radioaktivno obilježenih anti-HBs protutijala. Nevezana anti-HBs odstranjuju se pranjem i potom se mjeri radiokativnost J-125 vezanog na čvrstoj fazi (tada plastične kuglice). Osjetljivost se izrazito povećala, od nekoliko $\mu\text{g/mL}$ na do nekoliko ng/mL . Također se objektiviziralo i očitavanje reakcije, koje je sada postalo kvantitativno i zamijenilo subjektivno vizualno očitavanje. Novi test brzo je uveden u testiranje krvi davatelja te u dijagnostici virusnih hepatitisa. Međutim, test je imao nedostatak, radioaktivnost. Stoga je veliki korak unaprijed bio obilježavanje protutijela enzimima i kasnije s kemiluminescentnim molekulama/skupinama.

Test za detekciju HBsAg-a uskoro je komplementiran testom za detekciju protutijela na HBsAg (anti-HBs) i HBcAg-a (anti-HBc). Biljezi HBV infekcije i njihovo značenje prikazani su u *tablici 1.3*. Od početka 1980.-tih za određivanje infekcije ili imunog statusa u pacijenata koriste se u rutinskom testiranju tri biljega: HBsAg, anti-HBs i anti-HBc.

Tehnike po Ouchterlony-ju nisu bile dovoljno osjetljive za anti-HBs pa su se detektirale jedino vrlo visoke koncentracije anti-HBs-a, i to prije 1972. godine u pacijenata oboljelih od hemofilije koji su često primali transfuzije. HBV neutralizacijski testovi nisu tada bili dostupni. Prvi odgovarajući test za detekciju anti-HBs-a plasirao je na tržište Abbott Laboratories 1975. godine. Test je također bio RIA test i koristio je HBsAg obilježen J-125. Test je bio iznimno važan za razvoj i licenciranje cjepiva protiv HBV-a.

Prvi eksperimentalni testovi za detekciju anti-HBc-a (u 1970.-tim godinama), uključujući CFR (od *engl.* Complement Fixation Reaction), koristili su HBcAg iz inficirane jetre ili iz Dane čestica, a kasnije rekombinantni HBcAg iz *Escherichiae coli* (Pasek i sur., 1979) ili kvasca (Gerlich, 2013). Prema Gerlichu, s prirodnim HBcAg-om dobivali su se visoko specifični rezultati, dok testovi koji koriste rekombinantni HBcAg imaju određeni postotak nespecifičnih reakcija, a što je problem do danas. 1982. godine lansiran je na tržište prvi komercijalni enzimimuno (*engl.* Enzyme ImmunoAssay, EIA) test za anti-HBc. U sljedećim godinama anti-

HBc test koristio se u testiranju krvi davatelja kao surogatni test za hepatitis C i/ili HIV infekciju, a zbog djelomično istog načina prijenosa HBV-a, HCV-a i HIV-a.

Prvi test za anti-HBc IgM protutijela bio je veliki napredak u virusnoj dijagnostici, a lansiran je gotovo i kada test na anti-HAV IgM, 1979. godine, jer je omogućio lakše razlikovanje akutne od kronične HBV infekcije (Gerlich i Lüer, 1979). Čvrsta faza testa sadrži anti-IgM (anti- μ lanac) koja vežu/hvataju (*engl. capture; capture testovi*) IgM iz uzorka. Nakon dodatka HBcAg-a, koji se veže za specifične IgM, reakcija je mjerljiva preko označenih protutijela. I danas je ovaj princip standardan za mnoga antivirusna IgM protutijela.

Tablica 1.3. Biljezi HBV infekcije i njihovo značenje

HBsAg	<i>Hepatitis B površinski antigen</i> je biljeg infektivnosti. Njegova prisutnost indicira akutnu ili kroničnu HBV infekciju. - kada je HBV infekcija potpuno pod imunom kontrolom, HBsAg nestaje, a ostaju prisutna anti-HBc i obično anti-HBs - u kroničnoj infekciji i anti-HBc ostaju pozitivna - određivanje koncentracije HBsAg-a koristi se za: selekciju pacijenata za terapiju, praćenje odgovora na terapiju i praćenje rezistencije
Anti-HBs	<i>Protutijela na HBsAg</i> su biljeg imunosti. Njihovo prisustvo indicira imuni odgovor na HBV infekciju, imuni odgovor na cijepljenje, ili prisustvo pasivno stečenih protutijela.
Anti-HBc (ukupna)	<i>Protutijela na sržni antigen (HBcAg)</i> su nespecifični biljeg akutne, kronične ili razriješene HBV infekcije, ali se pojavljuju također i nakon klinički neprepoznate tihe HBV infekcije. - mogu se odrediti prije cijepljenja kako bi se otkrila prethodna ekspozicija HBV infekciji - ukoliko su prisutna samo anti-HBc bez HBsAg-a, pacijent može i tada razviti hepatitis - pozitivna anti-HBc protutijela mogu značiti i prisutnu OBI infekciju, a riječ "okultna" se odnosi na nedostatak HBsAg-a, odnosno na nemogućnost njegove detekcije. Kao biljeg OBI-ja, prepoznat je 1970.-tih godina (Hoofnagle i sur., 1978). Zbog toga se u mnogim zemljama, kako bi se povećala sigurnost transfuzijskog liječenja, krv davatelja testira i na HBsAg i na anti-HBc (npr. u Njemačkoj od 2006. godine) - određivanje anti-HBc-a važno je i prije imunosupresijske terapije jer se OBI može reaktivirati zbog toga (Galbraith i sur., 1975). Reaktivacija se može suprimirati s preemtivnom terapijom ako se problem unaprijed prepozna.

Anti-HBc IgM	<i>IgM subklasa protutijela iz Anti-HBc-a</i>. Njihovo prisustvo indicira akutnu infekciju s HBV-om, ≤ 6 mjeseci. - Obzirom da su anti-μ <i>capture</i> testovi izuzetno osjetljivi, neki pacijenti s razriješenom akutnom HBV infekcijom, mogu ostati pozitivni godinama, čak i neki pacijenti s kroničnom HBV infekcijom bez poznate akutne faze infekcije. Jedan od razloga je taj što je HBcAg neovisan o T-stanicama i može aktivirati B-stanice na stvaranje anti-HBc IgM (Milich i McLachlan, 1986). Jaka aktivacija B-stanica uzrokovana HBcAg-om može biti dio strategije imunog izbjegavanja HBV-a jer može interferirati s HBcAg specifičnim citotoksičnim T-staničnim reakcijama.
HBeAg	<i>Hepatitis B 'e' antigen</i> je biljeg visokog stupnja HBV infektivnosti, i korelira s visokom razinom HBV replikacije. - Serokonverzija HBeAg u anti-HBe te značajno sniženje koncentracije HBsAg-a je znak spontanog ili terapijom inducirano poboljšanja. Međutim, bez obzira na gubitak HBeAg-a kod mnogih pacijenata se nalazi progresija KHB jer virus ima enormnu mogućnost izbjegavanja T- i B-stanične imunosti i kada HBeAg više nije prisutan.
Anti-HBe	<i>Protutijela na HBeAg</i> mogu biti prisutna u inficiranoj ili imuniziranoj osobi. Kod pacijenata s kroničnom HBV infekcijom, njihovo prisustvo upućuje na nizak titar i nisku razinu infektivnosti.
HBV DNA	<i>HBV deoksiribonukleinska kiselina</i> mjera je VL i reflektira virusnu replikaciju. Korelira s infektivnošću. Koristi se za procjenu i monitoriranje KHB infekcije.

1.4. VAŽNOST DETEKCIJE ANTI-HBc-a U OTKRIVANJU OBI-ja U

TRANSFUZIJSKOJ MEDICINI

Svaki je oblik intervencije u sprječavanju prijenosa HBV-a od važnosti pa tako i testiranje krvi za transfuzijsko liječenje. Rizik od prijenosa HBV-a transfuzijama krvi i krvnih pripravaka danas je nizak, ali viši nego rizik prijenosa drugih virusa za koje je uspostavljeno obavezno testiranje i za koje, za razliku od HBV-a ne postoji cjepivo (Candotti i Allain, 2009). Posljedica je to varijabilnosti kliničke prezentacije HBV infekcije, imunosnog odgovora domaćina na nju, dinamike virusne replikacije i seroloških biljega, što otežava ne samo selekciju davatelja krvi

već i način njihovog testiranja. Od seroloških biljega u testiranju davatelja krvi danas se koristi HBsAg i anti-HBc. HBsAg je antigen virusne ovojnice koji tijekom replikacije virusa u jetri nastaje u suvišku i isplavljen u krv lako se dokazuje.

Anti-HBc nalazi se u krvi gotovo svih inficiranih osoba, a kako ostaje u cirkulaciji godinama ili doživotno, neovisno o tome je li došlo do eliminacije virusa i ozdravljenja, do kroničnog hepatitisa, nosilaštva ili okultne infekcije, test na anti-HBc korisniji je od drugih seroloških, ali i molekularnih testova (Jung i Pape, 2002). Najučinkovitiji je u otkrivanju osoba s kroničnom OBI infekcijom izazvanom virusom niske replikativne moći, koje je teško dokazati molekularnim testom (Seo i sur., 2015; Minegishi i sur., 2003). Anti-HBc se javlja u krvi novo-zaraženih osoba neposredno nakon virusnih antigena HBsAg-a i/ili HBeAg-a, kao prvi biljeg imunog odgovora domaćina na infekciju (Song i Kim, 2016). Visok titar anti-HBc-a posljedica je izravne i o T-stanicama ovisne stimulacije B limfocita HBcAg-om, koji je najjači imunogeni virusni protein (Milich i McLachlan, 1986). Titar anti-HBc-a varira tijekom infekcije i kronične bolesti i korelira s razinom virusne replikacije u hepatocitima, a za razliku od koncentracije HBsAg-a, kretanje titra anti-HBc-a neovisno je o genotipu. Titar veći od 1:100 indicira perzistenciju cccDNA u jezgri hepatocita (Seeger i Mason, 2000). Mjerenje titra anti-HBc-a u krvi mogući je neinvazivan oblik dijagnostike kronične bolesti jetre inducirane virusom hepatitisa B, a uz kvantitativni HBsAg test jedan od mogućih načina praćenja učinkovitosti antivirusne terapije (Yuan i sur., 2015; Song i sur., 2014; Brunetto i sur., 2013). Pozitivan nalaz anti-HBc-a bez antigenemije najčešći je u osoba s klinički ili asimptomatski preboljelim hepatitisom B. Uz pozitivan nalaz anti-HBs-a i/ili anti-HBe-a, anti-HBc jest dugotrajan pokazatelj ozdravljenja. Anti-HBc *per se* je nezamjenjiv serološki biljeg HBV infekcije u otkrivanju tzv. *teil-end* faze infekcije, koja prethodi rekonvalescenciji, te u otkrivanju seropozitivne OBI infekcije (Raimondo i sur., 2008; Lee, 1997).

Iako seropozitivna OBI infekcija uključuje sve HBsAg negativne serološke profile, izolirani nalaz anti-HBc odnosno samo anti-HBc pozitivan rezultat (anti-HBc *alone* ili *only*) bez drugih HBV specifičnih protutijela u krvi najčešći je u osoba s OBI-jem, zbog čega je test na anti-HBc uveden u ispitivanje davatelja i primatelja organa i davatelja krvi (Grob i sur., 2000; Brechot i sur., 2001). U SAD-u je testiranje davatelja krvi na anti-HBc uvedeno 1986. godine. Sumnja na prijenos HBV-a krvlju anti-HBc pozitivnih davatelja krvi, postavljena je kasnih 1970.-tih, ali je potisnuta i nakratko zanemarena pred izazovima novo otkrivenih krvlju prenosivih virusa (HIV i HCV) (Katchaki i sur., 1980).

U nedostatku HIV specifičnog testa, anti-HBc je u SAD-u korišten kao biljeg rizičnog spolnog ponašanja, s visokom učinkovitošću kod etabliranih HIV infekcija, a slabijom kod HIV infekcije u WP-u (Simon i Bankhurst, 1984; Korelitz i sur., 1996; Bush i sur., 1997). Obveznim testom, kao surogatni test za tzv. *non-A, non-B hepatitis* (NANBH), kasnije virusni hepatitis C (HCV), uveden je u SAD-u i drugim visokorazvijenim zemljama. Njegovom primjenom došlo je do redukcije ne samo postransfuzijskog hepatitisa C, već i postransfuzijskog hepatitisa B, zbog čega se u SAD-u nakon uvođenja anti-HCV-a, nastavilo s njegovim korištenjem u ispitivanju krvi za transfuzijsko liječenje. Procjenjuje se da je tim uvođenjem na ovaj način u SAD-u reducirana postransfuzijski hepatitis B za 33 do 50 % (Blajchman i sur., 1995; Chambers i Popovsky, 1991; Allain i sur., 1999). Prevalencija anti-HBc-a u dobrovoljnih davatelja u SAD-a je 0,23 %, Ujedinjenom Kraljevstvu 0,56 %, Danskoj 0,70 %, Japanu 1,1 %, Njemačkoj 1,88 %, Italiji 4,85 %, Indiji 10,82 %, Južnoj Koreji 13,5 %, Egiptu 14,2 %, Grčkoj 14,9 % i Pakistanu 17,28 % (Seo i sur., 2015).

Transplantacija organa, posebno jetre, nedvojbeno je potvrdila značenje anti-HBc-a za sigurnost primatelja. Američka iskustva pokazala su visoku prediktivnu vrijednost anti-HBc-a kod donora organa za prijenos HBV presadkom, ali jednako tako i kod primatelja presadka bez antivirusne terapije za razvoj reaktivacijskog hepatitisa B (Dickinson i sur., 1997). Sve to rezultiralo je uvođenjem anti-HBc testa u ispitivanju davatelja organa.

Uvođenje NAT-a u ispitivanju davatelja krvi dovelo je do spoznaje učinkovitosti anti-HBc-a u otkrivanju OBI infekcije, ali kvalitativni anti-HBc test ne diskriminira zaražene od nezaraženih davatelja zbog čega je njegova uporaba u populacijama visoke prevalencije uvjetovana paralelnim testiranjem molekularnim testom, ispitivanjem titra ili drugih HBV biljega (Allain, 2004; Stramer i sur., 2012; Lelie i sur., 2017; O'Brien i sur., 2007). Prevalencija OBI-ja u populaciji davatelja krvi u europskim zemljama varira od 0,0002 % do 0,084 % (Raimondo i sur., 2007; Dettori i sur., 2009; Velati i sur., 2008; Brojer i sur., 2006; Katsoulidou i sur., 2009; Svicher i sur., 2012), dok je u Kini, koja je visoko endemična HBV regija, 0,18 % (Huang i sur., 2012).

Anti-HBc se u posljednje vrijeme koristi i kao suplementni test u algoritmu potvrde inicijalno i opetovano reaktivnih (RR) davatelja krvi u ID-NAT testu, kada HBV DNA u krvi nije moguće potvrditi diskriminacijskim ID-NAT testom i/ili kvantitativnim HBV DNA testom visoke osjetljivosti. To su uglavnom davatelji s manje od 20 IU HBV DNA u mililitru krvi. Test na anti-HBc nije zahtjevan u izvedbi na automatiziranim sustavima i temelji se na kompetitivnom ili izravnom (sandwich) principu EIA/ChLIA testova. Osjetljivost testa

određuje se prema Internacionalnom standardu WHO, a specifičnost varira zavisno o tipu testa (Hourfar i sur., 2009).

Pokazalo se da se transfuzijama onih krvnih pripravaka koji su samo anti-HBc pozitivni (ostali HBV biljezi negativni uključujući i HBV DNA) može prenijeti HBV. Za prevenciju virusne infekcije u takvim slučajevima ključno je odrediti anti-HBc (Gessoni i sur., 2014). Prijenos HBV-a na primatelje krvi od DDK-a s OBI-jem ispitaio je Satake sa suradnicima (Satake i sur., 2007). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da se takav prijenos događa u oko 3 % slučajeva. Oni su također pokazali da se u 50 % prijenosa HBV-a na primatelje krvnih pripravaka događa u slučajevima prisutne virusne infekcije u WP-u. Infektivnost krvi u WP-u infekcije 10 puta je viša nego u OBI-ju s niskim titrom anti-HBc-a. Pojavnost OBI-ja u Europi iznosi 1:1000 do 1:50.000 donacija krvi (Allain i sur., 2013). Allain i suradnici utvrdili su da postotak prijenosa HBV-a od dobrovoljnih davatelja s OBI-jem iznosi 28 %. U toj studiji svi dobrovoljni davatelji imali su anti-HBc i detektabilnu količinu HBV DNA, a 38 % njih imalo je i anti-HBs u titru od 20 do 160 IU/L. Postotak prijenosa HBV-a s anti-HBs negativnim krvnim pripravcima od dobrovoljnih davatelja s OBI-jem ovisi i o vrsti krvnih pripravaka, najniži je kod transfuzije eritrocita, viši kod transfuzije trombocita, a najviši kod transfuzije svježe plazme. Prisutnost anti-HBs-a kod dobrovoljnih davatelja s OBI-jem smanjuje rizik od prijenosa infekcije za oko 5 puta. U slučajevima necijepljenih primatelja krvnih pripravaka od davatelja s OBI-jem projicirana transfundirana doza virusa je 1032 kopija u anti-HBc negativnih i 2694 kopija u anti-HBc pozitivnih primatelja. 66,7 % imunokompetentnih primatelja bilo je anti-HBc pozitivno, a svega 33 % imunokompromitiranih nakon transfuzije. Prema tome, prijenos HBV-a od dobrovoljnih davatelja s OBI-jem većinom je asimptomatska i samorješiva infekcija s postupnim razvojem anti-HBc-a i anti-HBs-a. Međutim, u imunokompromitiranih primatelja može biti fatalna. Takvi su slučajevi opisani kod primatelja sa sepsom, hematološkom bolešću i autoimunim hepatitisom.

Literaturni podaci ukazuju da bi se, za smanjenje rizika od prijenosa HBV-a transfuzijama krvnih pripravaka, krv dobrovoljnih davatelja trebala analizirati na prisutnost anti-HBc-a u zemljama s prevalencijom anti-HBc-a manjom od 2 do 4 %. U zemljama s višom prevalencijom čini se nužnim detektirati HBV DNA u uzorcima krvi dobrovoljnih davatelja. Osim analiziranja krvi dobrovoljnih davatelja na prisutnost anti-HBc-a i HBV DNA, za smanjenje rizika od prijenosa HBV-a krvnim pripravcima može se poduzeti i inaktivacija patogena kemijskim agensima i UV zračenjem koji sprječavaju replikaciju DNA ili RNA. Za prevenciju ostaje i mogućnost cijepljenja potencijalnih primatelja.

Isto tako treba napomenuti da bi odbacivanje anti-HBc pozitivnih, a HBV-DNA negativnih krvnih donacija, utjecalo na opskrbu krvnim pripravcima u Republici Hrvatskoj. Njemačka i Nizozemska koriste takve krvne donacije ukoliko je titar anti-HBs-a viši od 100 IU/L odnosno 200 IU/L (Hourfar i sur., 2009; Van de Laar i sur., 2015).

Koji će se testovi koristiti u ispitivanju davatelja krvi na HBV zavisi o prevalenciji ove infekcije u općoj i populaciji davatelja krvi, morbiditetu vezanom uz transfuziju krvnih pripravaka, omjeru novih i višestrukih davatelja, samodostatnosti u opskrbi krvlju i ekonomskim mogućnostima zemlje, a u primjeni su 4 strategije u kojima se kombiniraju serološki i/ili serološki i molekularni testovi.

1.5. STRATEGIJE TESTIRANJA DAVATELJA KRV I NA HBV DANAS

Strategija A: samo HBsAg test: Ova strategija, ovisna o osjetljivosti HBsAg testa, globalno prevladava (WHO, 2017; Scheiblaue i sur., 2010). Prema izvješću WHO za 2016. godinu 56 % zemalja članica (98/176) ju koristi (u Europi 32,5 % ili 14/43). Visoko osjetljivi HBsAg testovi podrazumijevaju jednako visoku osjetljivost za sve serotipove HBsAg-a i mutirane varijante (Kuhns i Busch, 2006). Usprkos visoke osjetljivosti aktualnih HBsAg testova, ova je strategija testiranja primjerenija zemljama niske prevalencije HBV-a i visoke procijepljenosti. Nedostatak joj je dug WP HBsAg testa, oko 38 dana, što ograničava njegov doprinos u ranoj akutnoj fazi infekcije, ali i ranoj rekonvalescenciji kada se antigen gubi iz krvi, a zaostaje niska virusna replikacija (u *teil end* fazi infekcije). Ovom strategijom nije moguće identificirati davatelje s OBI infekcijom koju karakterizira negativan nalaz HBsAg-a u krvi.

Strategija B: HBsAg i anti-HBc test: Ova strategija kao i strategija A ima HBsAg-ovisnu osjetljivost u ranoj akutnoj fazi infekcije, ali joj zato anti-HBc test omogućava detekciju *teil-end* faze infekcije i seropozitivne OBI infekcije. Nedostatak joj je niska prediktivna vrijednost pozitivnog anti-HBc u otkrivanju zaraženih davatelja i nemogućnost detekcije seronegativne OBI infekcije. Učinkovitost strategije B korelira s prevalencijom anti-HBc-a i dobi davatelja, a učinkovitija je u bankama krvi s dominantnim učešćem višestrukih (starijih) davatelja krvi. Ovu strategiju prema izvješću WHO u 2016. godini koristi 17,6 % (31/176) zemalja globalno (u

Europi 9,3 % ili 4/43). Dodatno, 5 zemalja globalno, (3 u EU), anti-HBc testiranje provode selektivno.

Strategija C: HBV DNA (NAT) i HBsAg test: HBV DNA test osigurava osjetljivost tijekom rane HBV, *teil-end* faze infekcije i okultne seropozitivne i seronegativne kronične HBV infekcije. Učinkovitost ove kombinacije testova limitirana je osjetljivošću NAT testa, zbog čega ID-NAT ima prednost pred testiranjem puliranih uzoraka (Mini-Pul/MP-NAT), nekih proizvođača. Ova strategija je preporučena zemljama visoke HBV prevalencije i bankama krvi s dominacijom novih davatelja krvi kod kojih je nalaz HBV infekcije učestaliji. Prema WHO u 2016. godini 11,9 % (21/176) zemalja globalno (u Europi 27 % (12/43) provodi ovu strategiju testiranja.

Strategija D: HBV DNA, HBsAg i anti-HBc test: Tri testa u ovoj kombinaciji osiguravaju najvišu osjetljivost u detekciji HBV infekcije u svim njenim fazama i ovisna je o osjetljivosti NAT testa. Globalno je zastupljena u 7,4 % (13/176), (u Europi 11,6 % ili 5/43), međutim još 8 zemalja globalno od toga 5 u EU provode testiranje s tri testa uz selektivno testiranje anti-HBc testom.

O preostalim mogućim strategijama dokazivanja HBV infekcije u davatelja krvi poput uporabe samo molekularnog testa ili molekularnog testa u kombinaciji s anti-HBc vode se rasprave i analiziraju rezultati provedenih paralelnih ispitivanja molekularnim i serološkim testovima (Kuhns i Busch, 2006; Candotti i Laparche, 2018; Seed i sur., 2017). Pri odabiru strategije testiranja važno je paziti da se ne ugrozi opskrba krvlju, stoga je potrebno prije implementacije novog biljega odrediti njegovu prevalenciju i moguće negativne učinke njegovog uvođenja. U zemljama visoke i umjerene HBV endemičnosti, testiranje na anti-HBc i isključivanje pozitivnih davatelja može imati posljedice na opskrbu krvlju, zbog čega se ove strategije trebaju optimirati određivanjem titra anti-HBc-a ili titra anti-HBs-a.

1.6. SVRHA I CILJEVI RADA

OBI infekcija u davatelja krvi najčešći je uzrok prijenosa virusa hepatitisa B transfuzijama krvnih pripravaka. OBI se definira kao prisutnost virusne DNA bez prisustva HBsAg-a u krvi izvan WP infekcije. HBV DNA može se dokazati u jetri, a u krvi je uglavnom nedokaziva ili intermitentna jer je VL nizak, najčešće manji od 100, često i od 10 IU HBV DNA/mL. Kod OBI-ja nisu nužno prisutna specifična protutijela na virusne antigene, međutim ako jesu (seropozitivna OBI), najčešće su prisutna anti-HBc. Obzirom na negativan rezultat HBsAg-a i intermitentnu viremiju, prisutna anti-HBc jedini su biljeg koji može upućivati na OBI.

Kako testiranje krvi DDK-a u Republici Hrvatskoj uključuje serološke pretrage: HBsAg, anti-HCV, HIV Ag/At i anti-TP (protutijela na *Treponema pallidum*) te molekularni triplex ID-NAT (HBV DNA, HCV RNA and HIV-1/2 RNA) test, a ne uključuje testiranje na anti-HBc, glavni cilj i svrha ovog istraživanja jest odrediti ukupnu prevalenciju anti-HBc-a u populaciji DDK-a HZTM-a, te prevalenciju prema starosnoj dobi, spolu i broju davanja krvi DDK-a, u muških i ženskih te novih i višestrukih DDK-a, utvrditi važnost određivanja anti-HBc-a u detekciji OBI-ja, prevalenciju OBI-ja u populaciji DDK-a i procijeniti rizik od prijenosa HBV-a transfuzijama krvi uključujući DDK-e s OBI-jem. U tu svrhu analizirat će se prisutnosti anti-HBc-a i protutijela na druge antigene HBV-a te virusne DNA u arhivskim uzorcima DDK-a HZTM-a iz 2004. i 2013. godine te prospektivno u 2017. godini. HZTM je nacionalni referentni centar transfuzijske medicine koji godišnje prikupi preko 50 % svih doza krvi u Hrvatskoj (oko 100.000 doza).

Specifični ciljevi ovog istraživanja obuhvaćaju utvrđivanje prisutnosti odnosno prevalencije anti-HBc-a u populaciji DDK-a i avidnosti anti-HBc IgG-a, utvrđivanje prisutnosti HBV DNA među anti-HBc pozitivnim DDK-ima, određivanje titra anti-HBs-a te prisutnost ostalih HBV biljega (anti-HBc IgM, anti-HBe i HBeAg), utvrđivanje prevalencije OBI-ja i rizika od prijenosa HBV infekcije uključujući i DDK-e s OBI-jem temeljem matematičkog modela.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. MATERIJALI

2.1.1. Uzorci krvi DDK-a HZTM-a

- primarni uzorci krvi DDK-a uzeti su u epruvetu (Becton-Dickinson) od 10 mL, bez antikoagulansa, centrifugirani su 20 minuta na 2300 o/min
- u 2004. i 2013. godini nakon provedenog obveznog serološkog testiranja i svih rezultata obveznih testova (HBsAg, anti-HCV, HIV Ag/At i anti-TP), ostatni uzorci krvi (serum) arhivirani su na temperaturi nižoj od -20°C
- u 2017. godini ispitani su svježi, nezamrznuti uzorci krvi DDK-a nakon provedenog rutinskog serološkog testiranja, uz pisani pristanak DDK-a
- ispitivani uzorci pripadali su konsektivnim donacijama DDK-a zbog čega nisu stratificirani prema spolu, dobi i broju davanja
- na prisutnost anti-HBc-a ispitan (testiran) je sljedeći broj uzoraka: 7561 iz 2004. (listopad), 7318 iz 2013. (srpanj i kolovoz) i 5090 iz 2017. godine (svibanj)
- nakon određivanja prisutnosti anti-HBc-a, uzorci se skladište na temperaturi nižoj od -20°C
- za daljnje analize: anti-HBs, anti-HBc IgM, HBeAg, anti-HBe, avidnost anti-HBc IgG-a te HBV DNA.

2.1.2. Analizatori

U ovom istraživanju korišteni su sljedeći analizatori:

- ORTHO Summit Processor, Ortho Clinical Diagnostic, SAD;
- ETI-Max 3000, DiaSorin, Italija;
- Vitros ECi, Ortho Clinical Diagnostic, SAD;
- BEP III, Dade-Behring/Siemens Healthineers, SAD;

- Architect i2000_{SR}, Abbott Diagnostic, SAD;
- Evolis, Bio-Rad, USA;
- Vidas, bioMerieux, Francuska;
- Prism, Abbott Diagnostic, SAD;
- COBAS AMPLICOR, Roche, Švicarska;
- COBAS TaqMan 48, Roche, Švicarska;
- Procleix TIGRIS System, Grifols, Španjolska;
- Procleix PANTHER System, Grifols, Španjolska.

2.1.3. Kemikalije i testovi

2.1.3.1. Kemikalija korištena za pripremu uzoraka u određivanju avidnosti

anti-HBc IgG-a

- Gvanidin hipoklorit, 98 %, $\text{CH}_5\text{N}_3\text{HCl}$ (*Alfa Aesar, Njemačka*)

2.1.3.2. Testovi

U ovom istraživanju korišteni su komercijalni testovi prikazani u *tablici 2.1.* (preuzeto iz Miletić i sur., 2019; uz suglasnost nakladnika).

Tablica 2.1. Komercijalni testovi korišteni u istraživanju

Test	Godina istraživanja		
	2004.	2013.	2017.
Anti-HBc probirni test	Hepatitis B Virus Core Antigen ORTHO HBc ELISA Test System	Architect Anti-HBc II (Abbott)	Prism HBcore (Abbott)
Anti-HBc alternativni test 1	ETI-AB-COREK PLUS (DiaSorin)	Monolisa Anti-HBc PLUS (Bio-Rad)	Architect Anti-HBc II (Abbott)
Anti-HBc alternativni test 2	Vitros aHBc (Ortho)	Vidas Anti-HBc Total II (BioMerieux)	Vidas Anti-HBc Total II (BioMerieux)
HBsAg probirni test	Enzygnost HBsAg 5.0 EIA (Dade-Behring)	Prism HBsAg (Abbott)	Prism HBsAg (Abbott)
HBsAg alternativni test	Murex HBsAg Version 3	Monolisa HBsAg ULTRA (Bio-Rad)	Monolisa HBsAg ULTRA (Bio-Rad)
Anti-HBs	Vitros (Ortho)	Architect (Abbott)	Architect (Abbott)
Anti-HBc IgM	Vitros (Ortho)	Architect (Abbott)	Architect (Abbott)
Anti-HBe	Vitros (Ortho)	Architect (Abbott)	Not done
HBeAg	Vitros (Ortho)	Architect (Abbott)	Not done
HBV DNA test	HBV MONITOR/Cobas Amplacor (Roche) HPS/HBV Cobas TaqMan48 (Roche)	ID-NAT Procleix Ultrio Plus (HBV/HCV/HIV) (Grifols)	ID-NAT Procleix Ultrio Elite (HBV/HCV/HIV- 1/HIV-2) (Grifols)

2.2. METODE

2.2.1. Serološke metode

2.2.1.1. Hepatitis B Virus Core Antigen ORTHO HBV ELISA Test System,

Ortho Clinical Diagnostic, SAD - izvođen na ORTHO Summit Processor

analizatoru

ELISA (od *engl.* Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) kvalitativni test za detekciju ukupnih protutijela na hepatitis B sržni antigen, anti-HBc, u ljudskom serumu ili plazmi. Test je u formatu mikrotitarske ploče. Na jažicama je vezan rekombinantni rHBcAg dobiven iz *E. coli*. U prvom koraku u jažice se dodaje diluent i uzorak te se inkubiraju. Protutijelo prisutno u uzorku veže se za antigen na površini jažice. U koraku ispiranja uklonit će se svi nevezani proteini iz seruma ili plazme. U drugom koraku dodaje se konjugat u jažice (mišji monoklonski anti-ljudski IgG i anti-ljudski IgM konjugirani s peroksidazom iz hrena). Konjugat će se vezati za protutijela iz kompleksa antigen-protutijelo. Slijedi ispiranje. U trećem koraku dodaje se o-fenilendiamin (OPD) i hidrogen peroksid. Ako je prisutan vezani konjugat, OPD će oksidirati što rezultira stvaranjem boje. Sulfatna kiselina se dodaje za zaustavljanje reakcije.

Sadržaj test-kompleta:

- mikrotitarska ploča na koju je vezan rHBcAg;
- konjugat: smjesa mišjih monoklonskih anti-ljudski IgG i anti-ljudski IgM protutijela konjugiranih s peroksidazom iz hrena;
- diluent za uzorake: fosfatni pufer s goveđim proteinskim stabilizatorima;
- substrat: tablete s o-penilendiaminom;
- substratni pufer: citratni-fosfat s 0,02 % vodikovim peroksidom.

2.2.1.2. ETI-AB-COREK PLUS, DiaSorin - izvođen na ETI-Max 3000

analizatoru

Enzimski imunotest (EIA) za kvalitativnu detekciju ukupnih anti-HBc protutijela u ljudskom serumu ili plazmi (EDTA, citrat ili heparin). Test je u formatu mikrotitarske ploče. Koristi monoklonska protutijela usmjerena na imunodominantnu domenu HBcAg-a. Test je kompetitivni, a na jažicama su nanjena mišja monoklonska protutijela (IgG2b-k klasa) na HBcAg. Enzimski reagens koji sadrži ljudska antitijela na HBcAg obilježena peroksidazom iz hrena, detektirat će sva vezana anti-HBc iz uzorka. U prvom koraku u jažice se dodaje uzorak i rHBcAg. Ako postoji anti-HBc u uzorku, natjecat će se s protutijelima s površine jažice za rHBcAg. Slijedi ispiranje pa dodavanje enzima koji će se vezati za bilo koji kompleks antigen-protutijelo prisutan u jažici. Enzim se veže za čvrstu fazu preko rHBcAg i posljedična enzimska aktivnost je obrnuto ovisna o koncentraciji anti-HBc-a u uzorku. Nakon ispiranja dodaje se kromogen./substrat. Ako u uzorku nema anti-HBc-a, vezani enzim (peroksidaza iz hrena) kemijski reducira peroksid, koji oksidira kromogen (tetrametilbenzidin, TMB) u plavo obojenje (650 nm). Plava boja prelazi u žutu (450 nm) nakon dodatka stop otopine. Ako uzorak sadrži anti-HBc, jažica će ostati nebojana.

Sadržaj test-kompleta:

- enzimski reagens: ljudska protutijela na HBcAg obilježena peroksidazom iz hrena;
- neutralizacijska otopina: rekombinantni HBcAg (22 kDa, iz *E. coli*), pufer;
- pufer za ispiranje;
- inkubacijski pufer;
- kromogen/substrat: tetrametilbenzidin;
- stop otopina: 1 N sulfatna kiselina.

2.2.1.3. Architect Anti-HBc II test, Abbott - izvođen na automatskom

Architect i2000_{SR} analizatoru

CMIA (od *engl.* Chemiluminescent Microparticle ImmunoAssay) test za kvalitativnu detekciju anti-HBc-a u ljudskom serumu ili plazmi. Na paramagnetskim česticama vezan je rekombinantni HBcAg (rHBcAg). Prisutna protutijela anti-HBc tvore kompleks s rHBcAg-om vezanim na paramagnetske mikročestice. Potom se u reakcijsku smjesu dodaju sekundarna protutijela koja prepoznaju ljudske imunoglobuline, a konjugirana su s akridinom. Kemiluminiscencija, nastala nakon dodatka reagensa za njeno poticanje, mjeri se i izražava u relativnim svjetlosnim jedinicama (RLU).

Sadržaj test-kompleta:

- mikročestice s HBcAg (rekombinantni, iz *E. coli*) u TRIS puferu. konjgat: mišja anti-ljudska protutijela obilježena akridinom;
- diluent testa;
- diluent za uzorke;
- *pre-trigger* otopina: vodikov peroksid;
- *trigger* otopina: Na-hidroksid;
- otopina za ispiranje: fosfatni pufer.

2.2.1.4. Monolisa Anti-HBc PLUS, Bio-Rad - izvođen na Evolis analizatoru

ELISA test za detekciju ukupnih anti-HBc-a u ljudskom serumu ili plazmi. Test je u formatu mikrotitarske ploče. Na čvrstoj fazi vezan je rHBcAg. Ako su u serumu prisutna anti-HBc, vezat će se za čvrstu fazu. Nakon ispiranja dodaju se ljudska anti-IgG i IgM, obilježena peroksidazom, koja će se vezati za protutijela vezana za površinu jažica (čvrsta faza). Nakon drugog ispiranja dodaje se substrat. Raekcija se očitava spektrofotometrijski na 450/620-700

nm. Intezitet boje je proporcionalan koncentraciji anti-HBc-a u uzorku vezanih za čvrstu fazu testa.

Sadržaj test-kompleta:

- koncentrirana otopina za ispiranje (20x): Tris NaCl pufer;
- diluent za uzorke: PBS pufer;
- konjugat: kozja anti-ljudska IgG i IgM protutijela obilježena peroksidazom;
- pufer za peroksidazni substrat: citratna kiselina i Na-acetat;
- kromogen: TMB;
- stop otopina: 1 N sulfatna kiselina.

2.2.1.5. Prism HBcore, Abbott – izvođen na automatskom Prism analizatoru

ChLIA (od *engl.* ChemiLuminescent ImmunoAssay) test za kvalitativnu detekciju ukupnih anti-HBc u humanom serumu ili plazmi. Test je kompetitivni i ima 2 koraka. Mikročestice su obložene s rHBcAg-om i inkubiraju se s uzorkom i otopinom cisteina u inkubacijskoj jažici. Za vrijeme inkubacije, prisutna anti-HBc vezat će se za rHBcAg. Nakon ispiranja dodaje se ljudski anti-HBc konjugat obilježen akridinom. Konjugat će se vezati za rHBcAg koji nije blokiran s anti-HBc-om iz uzorka. Kemiluminescentni signal se generira dodatkom alkalne otopine vodikovog peroksida. Mjere se nastali fotoni, odnosno stvoreno svjetlo.

Sadržaj test-kompleta:

- rekombinantni HBcAg, iz *E.coli*;
- konjugat: ljudska anti-HBc obilježena akridinom;
- cisteinski puder;
- diluent za cistein;
- transfer otopina za ispiranje;

- konjugat otopina za ispiranje;
- koncentrat aktivatora;
- diluent za aktivator.

2.2.1.6. Vitros Anti-HBc test, Ortho Clinical Diagnostic – izvođen na automatskom Vitros ECi analizatoru

Kompetivni kemiluminescentni test za kvalitativnu detekciju ukupnih anti-HBc u humanom serumu i plazmi (EDTA i citrat). Na reakcijskim jažicama nanesen je HBcAg i ukoliko su anti-HBc prisutna u uzorku doći će do vezanja. Nakon ispiranja, dodaje se konjugat (mišja monoklonska anti-HBc obilježena peroksidazom iz hrena) koji će reagirati s preostalim HBcAg-om na površini reakcijske jažice. Nakon ispiranja, dodaje se reagens koji sadrži luminogeni substrat (derivat luminola) i agens za transfer elektrona. Peroksidaza katalizira oksidaciju derivata luminola što producira svjetlo. Svjetlo se očitava u Vitos ECi sustavu.

Sadržaj test-kompleta:

- rHBcAg iz *E.coli*;
- goveđi gamma globulini;
- konjugat: mišja monoklonska anti-HBc obilježena peroksidazom iz hrena;
- signalni reagens;
- otopina za ispiranje.

2.2.1.7. Vidas Anti-HBc Total II, bioMerieux – izvođen na automatskom

Vidas analizatoru

ELFA (od *engl.* Enzyme-Linked Fluorescent immunoAssay) kvalitativni test za detekciju ukupnih anti-HBc u ljudskom serumu i plazmi, baziran na inhibiciji. Kao čvrstu fazu testa koristi SPR (od *engl.* Solid Phase Receptacle). Uzorak se inkubira u SPR-u na čijoj unutrašnjosti je vezan rHBcAg. Nevezani uzorak se odstranjuje ispiranjem nakon čega se čvrsta faza inkubira s konjugatom: monoklonska anti-HBc obilježena alkalnom fosfatazom. Konjugat se veže za HBcAg za koja se nisu vezala anti-HBc iz uzorka. Nakon ispiranja, dodaje se substrat (4-metil-umbeliferil fosfat). Fosfataza iz konjugata će katalizirati hidrolizu substrata što rezultira fluorescentnim produktom (4-metilumbeliferonom), čija se fluorescencija mjeri na 450 nm. Intenzitet fluorescencije je obrnuto proporcionalan količini anti-HBc-a u uzorku.

Sadržaj test-kompleta:

- SPR;
- diluent za uzorke;
- pufer za ispiranje;
- konjugat: mišja monoklonska anti-HBc protutijela obilježena alkalnom fosfatazom;
- substrat: 4-metil-umbeliferil-fosfat.

2.2.1.8. Enzygnost HBsAg 5.0 EIA, Dade-Behring / Siemens – izvođen na BEP

III analizatoru

EIA test u formatu mikrotitarske ploče za kvalitativnu detekciju HBsAg-a u ljudskom serumu i plazmi. Test ima 2 koraka. U prvom, prisutan HBsAg u uzorku reagira s poliklonskim anti-HBs protutijelima vezanim na površini jažica mikrotitarske ploče i s konjugatom 1 (anti-HBs vezan s biotinom). U drugom koraku, nakon ispiranja nevezanih reaktanata, konjugat 2 (streptavidin vezan s peroksidazom) se dodaje i koji reagira s konjugatom 1. Nakon ispiranja,

određuje se enzimska aktivnost kojigata 2 (plava boja reakcije). Enzimatska konverzija kromogena se zaustavlja dodatkom stop otopine (žuto obojenje reakcije). Intezitet boje je proporcionalan koncentraciji antigena u uzorku.

Sadržaj test-kompleta:

- konjugat 1: mišja monoklonska anti-HBs konjugirana s biotinom;
- konjugat 2: streptavidin konjugiran s peroksidazom;
- kromogen: TMB;
- substrat;
- otopina za ispiranje;
- stop otopina.

2.2.1.9. Murex HBsAg Version 3, Murex – izvođen je na ORTHO Summit

Processor analizatoru, Ortho Clinical Diagnostic, SAD

EIA test u formatu mikrotitarske ploče za kvalitativnu detekciju HBsAg-a u ljudskom serumu i plazmi. Uzorak se u jažici preinkubira sa smjesom mišjih monoklonskih protutijela specifičnim za različite epitope 'a' determinante HBsAg-a. Pročišćena kozja anti-HBs konjugirana s peroksidazom iz hrena se tada dodaju u jažicu. Ako je HBsAg prisutan u uzorku, stvoriti će se kompleks anti-HBs - HBsAg - anti-HBs vezano s peroksidazom. Nakon ispiranja, dodaje se TMB i vodikov peroksid. Jažice koje sadrže HBsAg i vezani konjugat su ljubičasto obojene, a nakon dodatka stop kiseline obojenje je narančasto i mjeri se spektrofotometrijski.

Sadržaj test-kompleta:

- diluent za uzorke;
- kozja anti-HBs konjugirana s peroksidazom iz hrena;
- diluent za substrat;
- koncentrirani substrat: TMB;

- stop otopina: 0,5 M do 2 M sulfatna kiselina.

2.2.1.10. Prism HBsAg, Abbott – izvođen na automatskom Prism analizatoru

ChLIA test za kvalitativnu detekciju HBsAg-a u ljudskom serumu i plazmi. Postupak obuhvaća 2 koraka. Na mikročestice su vezana mišja monoklonska anti-HBs. Za vrijeme inkubacije prisutan HBsAg će se vezati za anti-HBs. Konjugat, koji sadrži kozja poliklonska anti-HBs obilježena akridinom, dodaje se u smjesu. Nakon druge inkubacije, ispiranjem se miče nevezani konjugat. Kemiluminescentni signal se stvara dodatkom alkalne otopine vodikovog peroksida. Mjere se nastali fotoni, odnosno svjetlo.

Sadržaj test-kompleta:

- mikročestice na koja su vezana mišja monoklonska IgM anti-HBs;
- konjugat: kozja poliklonska anti-HBs konjugirana s akridinom;
- transfer otopina za ispiranje;
- konjugat otopina za ispiranje;
- koncentrat aktivatora;
- diluent za aktivator.

2.2.1.11. Monolisa HBsAg ULTRA, Bio-Rad – izvođen na Evolis analizatoru

EIA test, sendvič principa, za detekciju HBsAg-a u ljudskom serumu i plazmi. Test je u formatu mikrotitarske ploče. Za jažice su vezana monoklonska anti-HBs. U jažice se dodaje uzorak i konjugat (mišja monoklonska anti-HBs i kozja poliklonska anti-HBs). Nakon inkubacije i ispiranja nevezanih reaktanata, dodaje se obojani substrat. Nakon inkubacije, ukoliko je prisutan HBsAg u uzorku stvara se obojena reakcija i dodatkom stop otopine žuto obojenje se optički mjeri na 450/620-700 nm.

Sadržaj test-kompleta:

- koncentrirana otopina za ispiranje;
- diluent za konjugat;
- konjugat: mišja monoklonska anti-HBs i kozja poliklonska anti-HBs vezana s peroksidazom;
- substratni pufer;
- kromogen: TMB;
- stop otopina: 1 M sulfatna kiselina.

2.2.2. Molekularne metode

- za kvantitativno određivanje HBV DNA u arhivskim uzorcima krvi dobrovoljnih davatelja iz 2004. godine koristio se COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Test, version 2.0. (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka)
- za molekularno testiranje arhivskih uzoraka krvi DDK iz 2013. godine koristio se ID-NAT test za istovremenu detekciju HBV DNA, HCV RNA i HIV1 RNA, Procleix Ultrio Plus (Grifols, Španjolska), a za kvantitativno određivanje real-time PCR COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Test, version 2.0. (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka)
- za molekularno testiranje uzoraka krvi DDK iz 2017. godine koristio se ID-NAT test za istovremenu detekciju HBV DNA, HCV RNA i HIV 1/2 RNA, Procleix Ultrio Elite (Grifols, Španjolska), a za kvantitativno određivanje real-time PCR COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Test, version 2.0. (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka).

2.2.2.1. COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Test, version 2.0.

COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV test v.2.0 služi kvantifikaciji HBV DNA, ujediniujući dva glavna procesa: (1) automatiziranu izolaciju HBV DNA na COBAS AmpliPrep uređaju, te (2) istovremeno umnožavanje ciljane DNA i detekciju razgradnje dvostruko obilježene probe smještene u visoko konzerviranoj *pre-core/core* regiji HBV genoma na COBAS TaqMan analizatoru. Koncentracija HBV DNA izražena je u IU/mL. Najniža mjerljiva koncentracija HBV DNA ovim testom je 20 IU/mL (95 %CI) – za sve genotipove HBV-a i matrix-a (prema deklaraciji proizvođača).

Sadržaj test-kompleta:

- COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV test v2.
- COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan Wash Reagent.

2.2.2.2. Procleix Ultrio Plus test

Procleix Ultrio Plus Test (Grifols) je triplex test koji objedinjuje izolaciju nukleinske kiseline; umnožavanje putem transkripcije (TMA) nukleinskih kiselina: HIV-1 RNA, HCV RNA i HBV DNA, te detekciju umnoženih produkata (amplikona) hibridizacijskom reakcijom (Hibridization Protection Assay, HPA). Testom se istovremeno detektiraju sve tri nukleinske kiseline, a signal pozitivnog rezultata jedinstven je za sva tri virusa, te zahtijeva diskriminacijsko testiranje, kojim se utvrđuje prisutnost HIV-1 RNA, HCV RNA ili HBV DNA.

Tijekom izolacije, virusna RNA i DNA oslobađaju se iz virusa pomoću detergenta, koji razgrađuje virusnu ovojnicu, te denaturira proteine. Oligonukleotidne sonde vežu konzerviranu regiju HIV-1, HCV i HBV genoma, i nastaje hibridna molekula, koja se iz uzorka izdvaja pomoću magnetskih čestica. TMA (od *engl.* Transcription-Mediated Amplification) je metoda amplifikacije nukleinske kiseline temeljene na transkripciji koja upotrebljava dva enzima, MMLV reverznu transkriptazu i T7 RNA polimerazu.

Detekcija umnoženih RNA produkata provodi se HPA (od *engl.* Hibridisation Protection Assay) testom. Odgovarajuće, jednolančane sonde za nukleinske kiseline, označene kemiluminescentnim molekulama, vežu se specifično za umnožene RNA produkte. Seleksijski reagens razlikuje vezane od nevezanih sonde, te uništava kemiluminescentne molekule na nevezanim probama. Kemiluminescentni signal koji proizvodi vezana sonda mjeri se luminometrom i bilježi u relativnim svjetlosnim jedinicama (RLU).

Interna kontrola (IC) dodaje se u svaki uzorak, kontrolu i kalibrator. IC prolazi sve korake testiranja, te ih na taj način kontrolira. Umnoženi RNA produkt za IC razlikuje se upotrebom sonde s relativno bržom kinetikom emisije svjetla u dualnoj kinetičkoj reakciji, pa se kinetički signal razlikuje kao bljesak (za umnožene produkte IC) i kao sjaj (za specifično umnožene produkte za HIV-1 RNA, HCV RNA i HBV DNA).

Diskriminacijsko testiranje koristi se za uzorke koji su ponovljeno reaktivni u Procleix Ultrio Plus testu. Pomoću specifičnih sonde za HIV-1 RNA, HCV RNA i HBV DNA utvrđuje se prisutnost navedenih nukleinskih kiselina virusa. Analitička osjetljivost testa za HBV (WHO 97/750) je 3,4 (95 %CI 3,0 do 4,1) IU/mL, a za diskriminacijski test 4,1 (95 %CI 3,5 do 4,9) IU/mL.

Sadržaj test-kompleta:

- Procleix Ultrio Plus Test K5000;
- Pufer za ispiranje (Wash solution);
- Ulje (Oil);
- Pufer za deaktivaciju plazme i umnoženih nukleinskih kiselina (Deactivation Fluid);
- „Auto detect“ 1;
- „Auto detect“ 2;
- Sredstvo za očuvanje sistemske tekućine (System Fluid Preservative for System Fluid).

2.2.2.3. Procleix Ultrio Elite test

Procleix Ultrio EliteTest (Grifols) je multiplex test koji objedinjuje izolaciju nukleinske kiseline; umnožavanje putem transkripcije (TMA) nukleinskih kiselina: HIV RNA, HCV RNA i HBV DNA, te detekciju umnoženih produkata (amplikona) HPA testom. Testom se istovremeno detektiraju prisutne nukleinske kiseline, a signal pozitivnog rezultata jedinstven je za sva tri virusa, te zahtijeva diskriminacijsko testiranje, kojim se utvrđuje prisutnost HIV-1/HIV-2 RNA, HCV RNA ili HBV DNA.

Tijekom izolacije, virusna RNA i DNA oslobađaju se iz virusa pomoću detergenta, koji razgrađuje virusnu ovojnicu, te denaturira proteine. Oligonukleotidne sonde vežu konzerviranu regiju HIV, HCV i HBV genoma, i nastaje hibridna molekula, koja se iz uzorka izdvaja pomoću magnetskih čestica. TMA upotrebljava dva enzima, MMLV reverznu transkriptazu i T7 RNA polimerazu.

Detekcija umnoženih RNA produkata provodi se testom HPA. Odgovarajuće, jednolančane sonde za nukleinske kiseline, označene kemiluminescentnim molekulama, vežu se specifično za umnožene RNA produkte. Seleksijski reagens razlikuje vezane od nevezanih sondi, te uništava kemiluminiscentne molekule na nevezanim probama. Kemiluminescentni signal koji proizvodi vezana sonda mjeri se luminometrom i bilježi u RLU jedinicama.

IC se dodaje u svaki uzorak, kontrolu i kalibrator. IC prolazi sve korake testiranja, te ih na taj način kontrolira. Umnoženi RNA produkt za IC razlikuje se upotrebom sondi s relativno bržom kinetikom emisije svjetla u dualnoj kinetičkoj reakciji, pa se kinetički signal razlikuje kao bljesak za umnožene produkte IC i kao sjaj za specifično umnožene produkte za HIV RNA, HCV RNA i HBV DNA).

Diskriminacijsko testiranje koristi se za uzorke koji su ponovljeno reaktivni u Procleix Ultrio Elite testu. Pomoću specifičnih sondi za HIV RNA, HCV RNA i HBV DNA utvrđuje se prisutnost navedenih nukleinskih kiselina virusa. Diskriminacijsko testiranje Procleix Ultrio Elite za HIV ne razlikuje HIV-1 od HIV-2. Analitička osjetljivost testa za HBV (WHO 97/750) je 4,3 (95 %CI 3,8 do 5,0) IU/mL, a za diskriminacijski test 4,5 (95 %CI 4,0 do 5,3) IU/mL.

Sadržaj test-kompleta:

- Procleix Ultrio Elite Test K5000;
- Pufer za ispiranje (Wash solution);

- Ulje (Oil);
- Pufer za deaktivaciju plazme i umnoženih nukleinskih kiselina (Deactivation Fluid);
- „Auto detect“ 1;
- „Auto detect“ 2;
- Natrijev hipoklorit (5-7 %)-varikina.

2.2.3. Metoda za određivanje avidnosti anti-HBc IgG-a

Avidnost anti-HBc IgG-a izražena je kao indeks avidnosti, a određena je prema postupku kojeg su opisali Rodella i suradnici (Rodella i sur., 2006). Potrebna su dva alikvota uzorka od 0,1 mL. Jednom alikvotu dodaje se Architect radni pufer (koncentrirani 1,5 M fosfatni pufer razrijeđen s destiliranom vodom u omjeru 1:10) (B), a drugom 1 M gvanidinijev hidroklorid u omjeru 1:10 (G). Inkubacija se provodi 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga, određuju se anti-HBc testom Architect Anti-HBc II. Indeks avidnosti izračunava se kao omjer dobivenih vrijednosti S/CO anti-HBc za reakcije u G i B. Arbitarna vrijednost razgraničenja (*engl.* cutoff, CO) za indeks avidnosti je 0,70, za dikriminaciju akutne i kronične faze infekcije.

2.2.4. Algoritam potvrde anti-HBc reaktivnosti

Svi anti-HBc pozitivni DDK-i iz 2004. 2013. i 2017. godine retestirani su istim testom u duplikatu i još dva alternativna anti-HBc testa, *tablica 2.1*. Potvrдно pozitivnim smatran je opetovano reaktivan uzorak potvrđen s najmanje anti-HBc testa. Svi anti-HBc pozitivni u 2004. i 2013. godini ispitani su na sve HBV markere, a 2017. samo na anti-HBc IgM i anti-HBs. HBsAg je u sve tri studije ispitivan i alternativnim testom kako bi se isključile eventualne 's'

mutacije HBV genoma. Infektivnost anti-HBc pozitivnih DDK-a ispitana je molekularnim kvantitativnim testom na HBV DNA 2004., a ID-NAT testom u 2013. i 2017. godini.

2.2.5. Statističke metode

Za statističku obradu rezultata koristio se program MedCalc, ver 16.2.1. DDK-i su za potrebu obrade dobivenih rezultata podijeljeni u starosne grupe (godine): do 20, 20-24, 25-29, 30-34, 35-39, 40-44, 45-49, 50-54, 55-59 i iznad 60, a prema preporukama za statistička istraživanja (Reijneveld, 2003). Za utvrđivanje razlike u broju uzoraka po različitim kategorijama, prevalencije anti-HBc-a, prisutnosti HBV DNA te pojavnosti ostalih HBV biljega koristi se test razlike proporcije (χ^2 -kvadrat test) uz razinu značajnosti 0,05. Za analizu korelacije koristi se Spearmanov koeficijent korelacije uz razinu značajnosti 0,05. Za izračun ostatnoga rizika od prijenosa HBV-a krvnim pripravcima od DDK-a s OBI-jem i DDK-a s negativnim nalazima HBV testova korišten je računski postupak prema Preporukama Europske medicinske agencije (EMA 2016), a koja uključuje rizik od prijenosa infekcije od novih i višestrukih DDK-a. Metoda po Newcombe-u korištena je u izračunavanju 95 % intervala pouzdanosti (CI).

2.2.5.1. Izračun ostatnog rizika od prijenosa HBV-a krvnim pripravcima doza

DDK-a ispitanih važećim obveznim testovima na HBV

Temeljem epidemioloških podataka vezanih uz HBV infekciju u populaciji DDK-a procjenjuje se ostatni rizik (*engl.* Residual Risk, RR) od prijenosa infekcije HBV-a donacijama krvi novih (ND) i višestrukih (VD) DDK-a, koje su testirane i bile negativne u važećim obveznim testovima propisanim zakonom Republike Hrvatske. RR se izražava kao broj ostatnih zaraženih donacija na milijun donacija.

Procjena RR-a temelji se na matematičkom modelu koji koristi epidemiološke podatke definirane preporukama EMA 2016 za prikazivanje epidemioloških podataka vezanih uz krvlju prenosive bolesti.

Parametri za izračunavanje ostatnog rizika su:

1. Incidencija HBV-a u višestrukih DDK-a

Incidencija se prema EMA 2016 definira kao godišnja stopa potvrđeno pozitivnih na HBV (HBsAg i HBV DNA) u populaciji VD-a. Sukladno preporuci izražava se na 100.000 višestrukih DDK-a;

$$\text{Incidencija HBV} / 100.000 \text{ VD} = n \text{ HBV pozitivnih} / \text{ukupan broj VD u godini} \times 100.000$$

2. Korekcija incidencije HBV-a u VD zbog nemogućnost detekcije HBV infekcije u slučaju OBI infekcije, mutacija virusa i eventualnih grešaka u radu te interdonacijskih perioda manjih od 180 dana;

$$\text{Korigirana incidencija} / 100.000 \text{ VD} = \text{Incidencija HBV} / 100.000 \text{ VD} \times 2,9$$

3. Prevalencija HBV-a u ND /100.000 ND izračunava se iz korigirane incidencije / 100.000 VD množenjem s faktorom 3;

$$\text{Prevalencija HBV} / 100.000 \text{ ND} = \text{Korigirana incidencija} / 100.000 \text{ VD} \times 3$$

4. **WP** je vrijeme u kojem se HBV infekcija ne može dokazati serološkim i/ili molekularnim testom, a odnosi se na akutnu HBV infekciju. Prema Preporukama EMA 2016 za 2013. godinu uzima se WP od 35 dana, a za 2017. godinu od 15 dana, a izražava se u godinama. WP za 2004. iznosi 56 dana temeljeno na osjetljivosti primjenjenog HBsAg testa u HZTM-u.

$$\text{WP}_{2004} = 56/365 = 0,153 \text{ god.}$$

$$\text{WP}_{2013} = 35/365 = 0,096 \text{ god.}$$

$$\text{WP}_{2017} = 15/365 = 0,041 \text{ god;}$$

5. Udio ND u ukupnom broju donacija krvi u godini izračunava se tako da se broj donacija ND podijeli sa ukupnim brojem donacija prikupljenih od ND i VD u navedenoj godini;

6. Formula za izračunavanje RR-a uključuje sve navedene parametre, kako bi se izračunao, prvo rizik od prijenosa HBV-a dozama VD, zatim dozama ND i konačno ukupni rizik za sve doze krvi prikupljene u HZTM-u 2004., 2013. i 2017. godine procijenjen prema udjelima doza ND i VD.

$$RR_{VD}/10^6 = \text{Korigirana incidencija} / 100.000 \text{ VD} \times 10 \times \text{WP (god)}$$

$$RR_{ND}/10^6 = \text{Prevalencija HBV} / 100.000 \text{ ND} \times 10 \times \text{WP (god)}$$

$$\text{Ukupni RR} / 10^6 = \text{udio donacija ND} \times RR_{ND}/10^6 + \text{udio donacija VD} \times RR_{ND}/10^6$$

3. REZULTATI

3.1. UVODNI PREGLED REZULTATA

Kako bi se utvrdila prevalencija anti-HBc-a u populaciji DDK-a HZTM-a, ispitano je 7561 uzoraka krvi iz 2004. godine, 7318 iz 2013. godine te 5090 iz 2017. godine. Za procjenu rizika od prijenosa HBV infekcije od DDK-a s OBI-jem, utvrđeni su DDK-i s OBI-jem te njihova prevalencija (u Republici Hrvatskoj i HZTM-u).

Za kvantitativno određivanje HBV DNA u arhivskim uzorcima krvi DDK-a iz 2004. godine korišten je test COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Test, version 2.0., a za molekularno testiranje arhivskih uzoraka krvi DDK iz 2013. godine ID-NAT test za istovremenu detekciju HBV DNA, HCV RNA i HIV1 RNA, Procleix Ultrio Plus, te za kvantitativno određivanje real-time PCR COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Test, version 2.0. Za molekularno testiranje uzoraka krvi DDK-a iz 2017. godine korišten je ID-NAT test za istovremenu detekciju HBV DNA, HCV RNA i HIV 1/2 RNA, Procleix Ultrio Elite, a za kvantitativno određivanje real-time PCR COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Test, version 2.0.

Serološko testiranje obuhvatilo je obvezno testiranje svake doze krvi DDK-a (HBsAg, anti-HCV, HIV Ag/At i anti-TP), anti-HBc test te alternativni HBsAg test kako bi se isključile moguće 's' mutacije HBV genoma. Obzirom na različitu specifičnost anti-HBc testova, korišten je algoritam potvrđivanja anti-HBc reaktivnosti: retestiranje pozitivnih rezultata u duplikatu istim testom te testiranje s još dva alternativna testa. Potvrđeno pozitivnim anti-HBc rezultatom smatran je onaj koji je pozitivan u najmanje dva različita anti-HBc testa. Potvrda OBI infekcija kao kroničnih infekcija postignuta je određivanjem avidnosti anti-HBc IgG-a. Svi anti-HBc pozitivni uzorci krvi ispitani su i na ostale biljege HBV infekcije: anti-HBs, anti-HBc IgM, anti-HBe i HBeAg.

Konačno, utvrđena je ukupna prevalencija anti-HBc-a kao mogućeg jedinog biljega OBI-ja, a uz negativne rezultate svih obveznih testova u ispitivanju krvi DDK-a Republike Hrvatske, te prevalencija prema starosnoj dobi, spolu i broju davanja krvi DDK-a, u muških i ženskih te novih i višestrukih DDK-a, prevalencija DDK-a s OBI-jem i ostatni rizik od prijenosa HBV-a krvnim pripravcima donacija uključujući DDK-a s OBI-jem.

3.2. KARAKTERISTIKE DAVALAŠTVA HZTM-a PO ISPITNIM

GODINAMA

3.2.1. Osnovne karakteristike davalaštva DDK-a HZTM-a po ispitnim

godinama

•Osnovne karakteristike davalaštva DDK-a HZTM-a po ispitnim godinama prikazane su u *tablici 3.1.*

Tablica 3.1. Karakteristike davalatstva krvi HZTM-a te uzoraka krvi/DDK-a uključenih u istraživanje u ispitnim godinama

Karakteristike DDK-a i donacija	Godina			Statistička analiza		
	2004.	2013.	2017.	χ^2 2004. vs 2013. 2013. vs 2017.	P 2004. 2013. 2013. 2017.	vs vs
Ukupni broj donacija krvi (n)	71.897	100.920	105.323			
Broj donacija ND-a (%)	7258 (10,1)	6176 (6,1)	6747 (6,4)	925,47 3,49	<0,001 0,06	
Broj donacija krvi VD-a (%)	64.639 (89,9)	94.744 (93,9)	98.576 (93,6)			
Ukupni broj DDK-a	39.011	49.003	50.445	604,89 12,73	<0,001 <0,001	
ND (%)	7258 (18,6)	6176 (12,6)	6747 (13,4)			
VD (%)	31.753 (81,4)	42.827 (87,4)	43.713 (86,6)			
Ukupan broj ženskih DDK-a (%)	7971 (20,4)	10.293 (21,0)	11.285 (22,4)	13,3 14,7	<0,001 0,001	
HBV prevalencija/10⁵ ND	220 (HBsAg)	97 (HBsAg & ID-NAT)	29,6 (HBsAg & ID-NAT)	203,4 297,4	<0,001 <0,001	
HBV incidencija/10⁵ VD	12,6	28	9,2	1,7 10,2	0,192 0,002	
Broj DDK ispitanih na anti-HBc (%) ukupno	7561 (19,4)	7318 (14,9)	5090 (10,1)			
Broj ND (%)	1098 (14,5)	340 (4,6)	310 (6,1)			
Broj ženskih DDK-a (%)	1312 (17,4)	956 (13,1)	812 (15,9)			
Broj muških DDK-a (%)	6249 (82,6)	6362 (86,9)	4278 (84,1)			
HBV Look-back/Trace back	4/0	11/0	4/0			

ND=Novi DDK su oni s koji prvi puta daju krv; VD=Višestruki DDK su oni koji su dali krv 2 puta i više

Look-back postupak je skup postupaka koji se provode nakon što se ustanovi da je davatelj krvi koji je već ranije darivao krv zaražen uzročnicima na koje se krv ispituje ili uzročnicima krvlju prenosivih bolesti za koje se ispitivanje ne provodi, a koji bi mogli naštetiti zdravlju primatelja krvi ili ako se naknadno ustanovi da postoji objektivna sumnja da test temeljem kojega je krvni pripravak pušten u uporabu nije mogao detektirati zarazu te da je zbog toga moglo doći do infekcije primatelja. Trace-back postupak je skup postupaka koji se provode kada se za laboratorijski potvrđenu zarazu postavi objektivna sumnja da je uzrokovana transfuzijom krvnog pripravka, a kako bi se ista isključila ili potvrdila.

3.2.2. Broj DDK-a uključenih u istraživanje razvrstan prema spolu i

broju davanja krvi

Broj DDK-a uključenih u studiju razvrstani prema spolu i broju davanja krvi prikazan je u *tablici 3.2.*

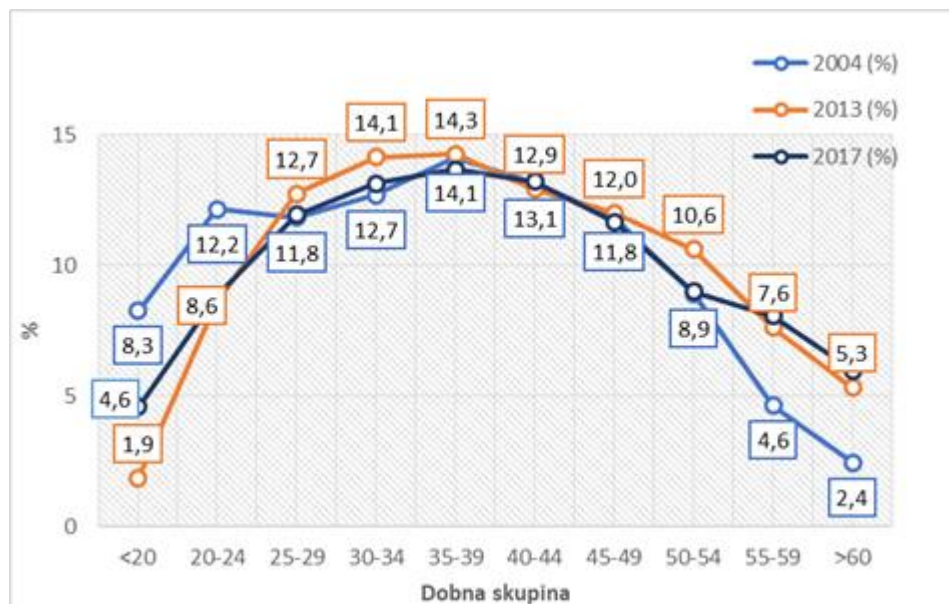
Tablica 3.2. Broj DDK-a uključenih u studiju razvrstani prema spolu i broju davanja krvi

Broj DDK-a ispitanih na anti-HBc	n 2004.	n 2013.	n 2017.
DDK ukupno	7561	7318	5090
M	6249	6362	4278
Ž	1312	956	812
ND	1098	340	310
M	748	194	192
Ž	350	146	118
VD	6463	6978	4780
M	5501	6168	4086
Ž	962	810	694

ND=Novi DDK su oni s koji prvi puta daju krv; VD=Višestruki DDK su oni koji su dali krv 2 puta i više;
M=muški DDK; Ž=ženski DDK

3.2.3. Udjeli dobnih skupina DDK-a uključenih u istraživanje

Udjeli dobnih skupina DDK-a uključenih u istraživanje prikazani su na slici 3.1.



Slika 3.1. Udjeli dobnih skupina DDK-a uključenih u istraživanje po godinama

Apscisa predstavlja dobne skupine DDK-a, a ordinata udjele DDK-a u postocima (%). U pravokutnicima su prikazani udjeli DDK-a u postocima po dobnim skupinama.

Udjeli anti-HBc ispitanih DDK-a razlikuju se u mlađih od 24 godine ($P < 0,05$) u sve tri studije, te u grupama preko 50 godina starosti 2004. u odnosu na 2013. i 2017. ($P < 0,05$).

Slično je i s distribucijom davatelja prema spolu. Statistički se značajno razlikuje udio muškaraca i žena ($P < 0,05$) u dobnim skupinama do 25 godina, muškaraca preko 50 godina 2004. prema 2013. i 2017. godini i žena preko 40 godina starosti u prve dvije studije.

Udio novih davatelja krvi u dobnim skupinama ispod 25 godina, i 25 do 50 godina je statistički značajno različit ($\chi^2 = 72,04$; $P < 0,05$ / $\chi^2 = 53,45$; $P < 0,05$) u sve tri studije. Među višestrukim davateljima krvi u sve tri godine studije udio mlađih od 25 godina značajno se razlikuje ($\chi^2 = 133,29$; $P < 0,05$), ali ne ako se usporedi 2013. s 2017. godinom ($\chi^2 = 1142$; $P = 0,285$). Razlikuje se zastupljenost davatelja starijih od 50 godina 2004. u odnosu na 2013 i 2017. godinu ($\chi^2 = 99,10$; $P = 0,05$). Nema razlike u udjelima višestrukih davatelja u dobi od 25-45 godina starosti ($\chi^2 = 1,23$; $P = 0,540$).

3.3. PREVALENCIJA ANTI-HBc-a U POPULACIJI DDK-a HZTM-a PO ISPITNIM GODINAMA

3.3.1. UKUPNA PREVALENCIJA ANTI-HBc-a U ISPITANIH DDK-a

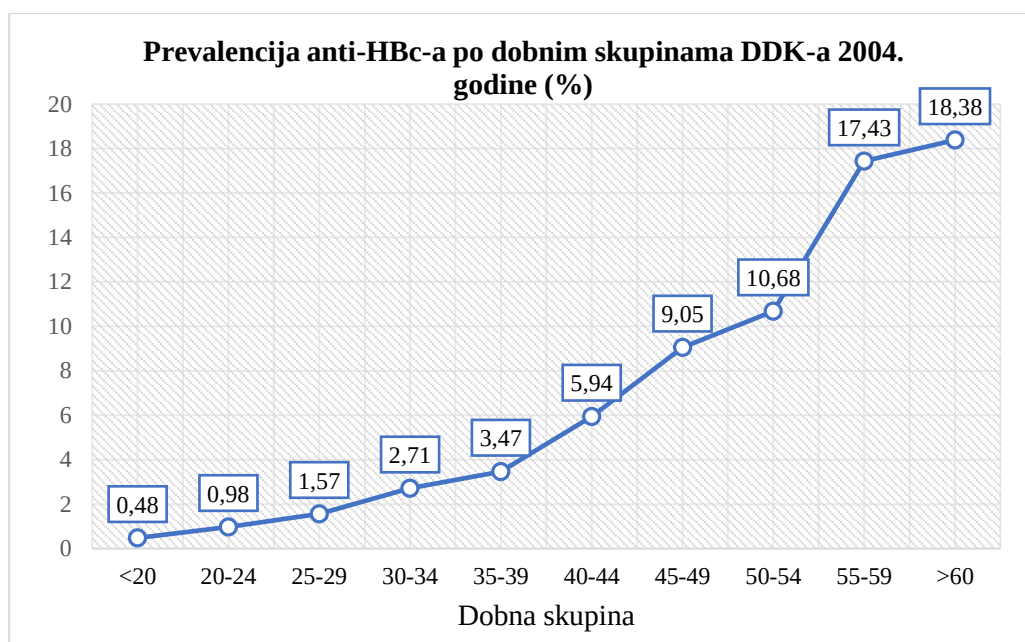
- Broj anti-HBc pozitivnih DDK-a bio je 396 u 2004. godini, 187 u 2013. godini i 67 pozitivnih u 2017. godini, među 7561, 7318 i 5090 ispitanih DDK-a;
- Ukupna prevalencija anti-HBc-a u ispitanih DDK-a u 2004. 2013. i 2017. godini bila je 5,24 %, 2,56 % i 1,32 %;
- Utvrđen je pad prevalencije anti-HBc-a u sve tri ispitne godine i u svim dobnim skupinama;
- Statistički je značajan pad prevalencije anti-HBc-a 2013. u odnosu na 2004. godinu s 5,24 % na 2,56 % ($\chi^2 = 75,74$; $P < 0,001$), kao i 2017. u odnosu na 2013. godinu s 2,56 % na 1,32 % ($\chi^2 = 22,97$; $P < 0,001$).

3.3.2. PREVALENCIJA ANTI-HBc-a PO DOBNIM SKUPINAMA DDK-a

Prevalencija anti-HBc-a po dobnim skupinama DDK-a za sve tri ispitne godine prikazana je u *tablici 3.3.* Prevalencija anti-HBc-a za 2004. godinu prikazana je na *slici 3.2.*, za 2013. godinu na *slici 3.3.* i za 2017. godinu na *slici 3.4.* Za sve tri godine prevalencija anti-HBc-a prikazana je na *slici 3.5.*

Tablica 3.3. Prevalencija anti-HBc-a po dobnim skupinama DDK-a

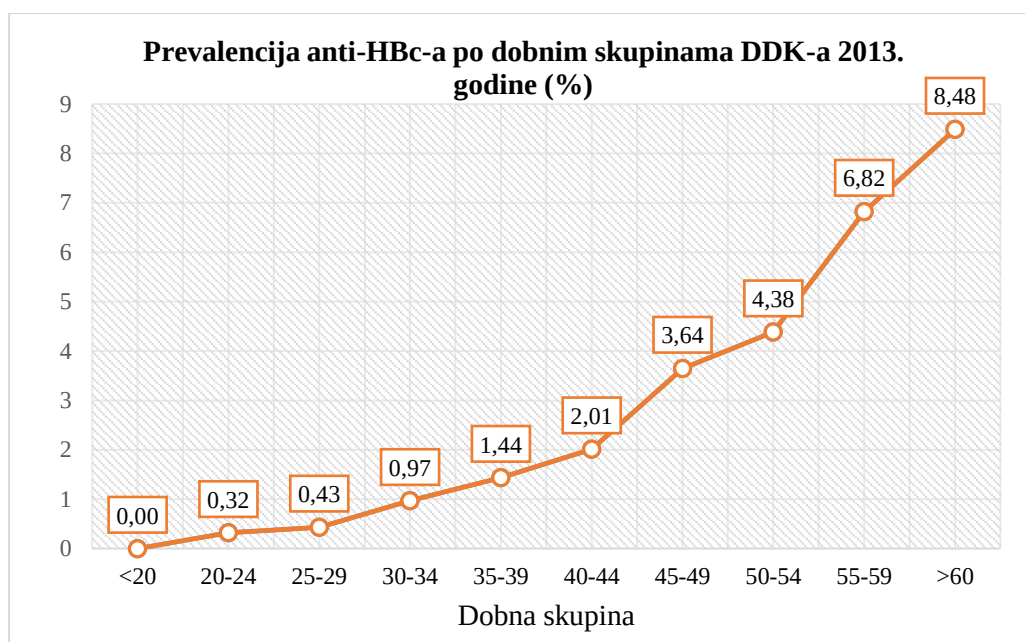
Anti-HBc prevalencija (%)					
Dobna skupina	2004.	2013.	2017.	P	χ^2
<20	0,48	0,00	0,00		
20-24	0,98	0,32	0,00	<0,001	16,32
25-29	1,57	0,43	0,16	<0,001	6,88
30-34	2,71	0,97	0,15	<0,001	32,06
35-39	3,47	1,44	0,43	<0,001	30,16
40-44	5,94	2,01	1,19	<0,001	12,26
45-49	9,05	3,64	1,01	<0,001	76,46
50-54	10,68	4,38	2,19	<0,001	42,84
55-59	17,43	6,82	4,39	<0,001	32,32
>60	18,38	8,48	6,58	<0,001	15,24
Ukupno	5,24	2,56	1,32	<0,001	22,98



Slika 3.2. Prevalencija anti-HBc-a po dobnim skupinama DDK-a u 2004. godini

Apscisa predstavlja dobne skupine DDK-a iz 2004. godine, a ordinata prevalencije anti-HBc-a u postocima (%). U pravokutnicima su prikazane izračunate prevalencije anti-HBc-a u postocima (%) po dobnim skupinama.

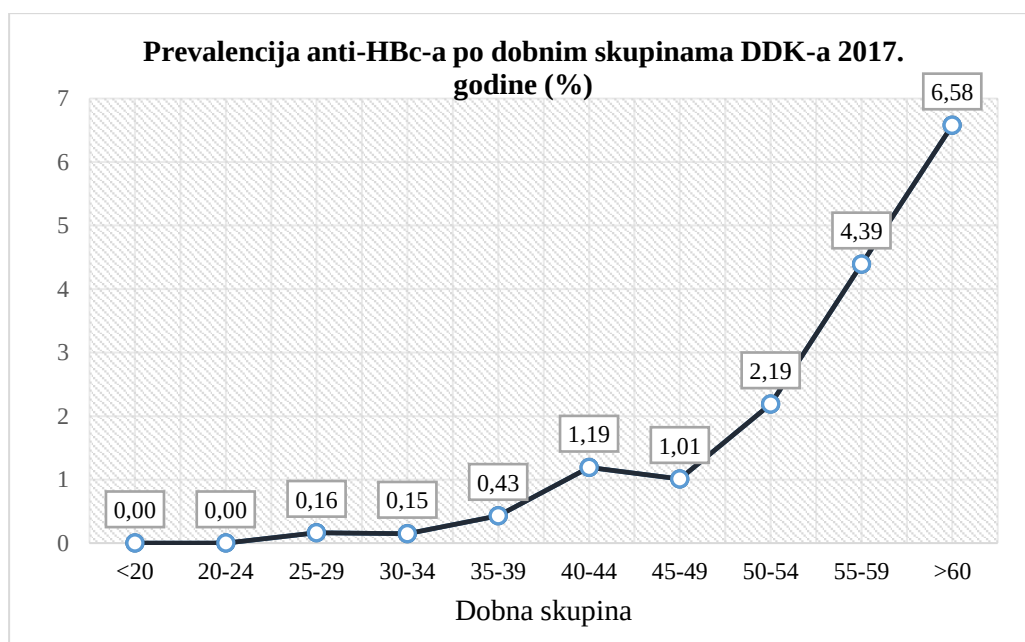
Ispitano je 7561 uzoraka krvi DDK-a iz 2004. godine. Prevalencija anti-HBc-a rasla je sa starošću DDK-a, i najniža je bila u DDK-a mlađih od 20 godina, 0,48 %, a najviša u onih starijih od 60 godina, 18,38 %.



Slika 3.3. Prevalencija anti-HBc-a po dobnim skupinama DDK-a u 2013. godini

Apscisa predstavlja dobne skupine DDK-a iz 2013. godine, a ordinata prevalencije anti-HBc-a u postocima (%). U pravokutnicima su prikazane izračunate prevalencije anti-HBc-a u postocima (%) po dobnim skupinama.

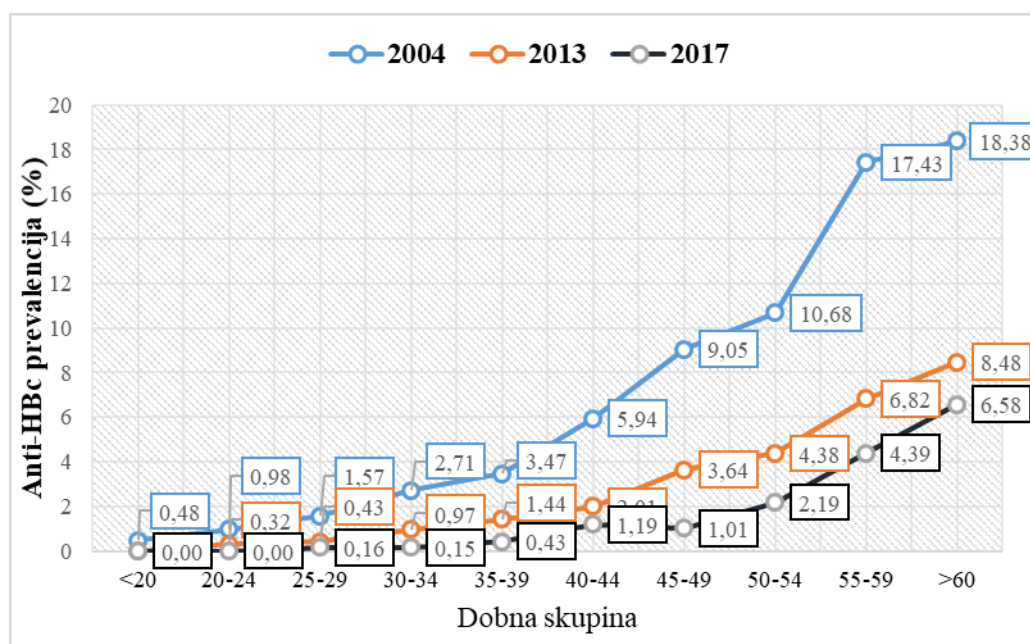
Ispitano je 7318 uzoraka krvi DDK-a iz 2013. godine. Prevalencija anti-HBc-a rasla je sa starošću DDK-a. U DDK-a mlađih od 20 godina nije bilo anti-HBc pozitivnih, dok je anti-HBc prevalencija u skupini DDK-a od 20 do 24 godine bila najniža, 0,32 %, a najviša u onih starijih od 60 godina, 8,48 %.



Slika 3.4. Prevalencija anti-HBc-a po dobnim skupinama DDK-a u 2017. godini

Apscisa predstavlja dobne skupine DDK-a iz 2017. godine, a ordinata prevalencije anti-HBc-a u postocima (%). U pravokutnicima su prikazane izračunate prevalencije anti-HBc-a u postocima (%) po dobnim skupinama.

Ispitano je 5090 uzoraka krvi DDK-a iz 2017. godine. Prevalencija anti-HBc-a rasla je sa starošću DDK-a. U DDK-a mlađih od 25 godina nije bilo anti-HBc pozitivnih, dok je anti-HBc prevalencija u skupini DDK-a od 25 do 29 godine bila 0,16 % i najviša u onih starijih od 60 godina, 6,58 %.



Slika 3.5. Prevalencija anti-HBc-a po dobnim skupinama DDK-a za tri ispitne godine

Apscisa predstavlja dobne skupine DDK-a, a ordinata prevalencije anti-HBc-a u postocima (%). U pravokutnicima su prikazane izračunate prevalencije anti-HBc-a u postocima (%) po dobnim skupinama DDK-a iz 2004., 2013. i 2017. godine.

Zaključci

1. Utvrđen je statistički značajan pad prevalencije anti-HBc-a u svim dobnim skupinama DDK-a u sve tri ispitne godine.
2. Pad prevalencije anti-HBc-a 2013. godine u odnosu na 2004. godinu zabilježen je u svim dobnim skupinama, a statistički značajan u skupinama preko 25 godina starosti ($P < 0,05$).
3. 2017. godine statistički značajan pad prevalencije ($P < 0,05$) zabilježen je u svim dobnim skupinama preko 20 godina starosti.

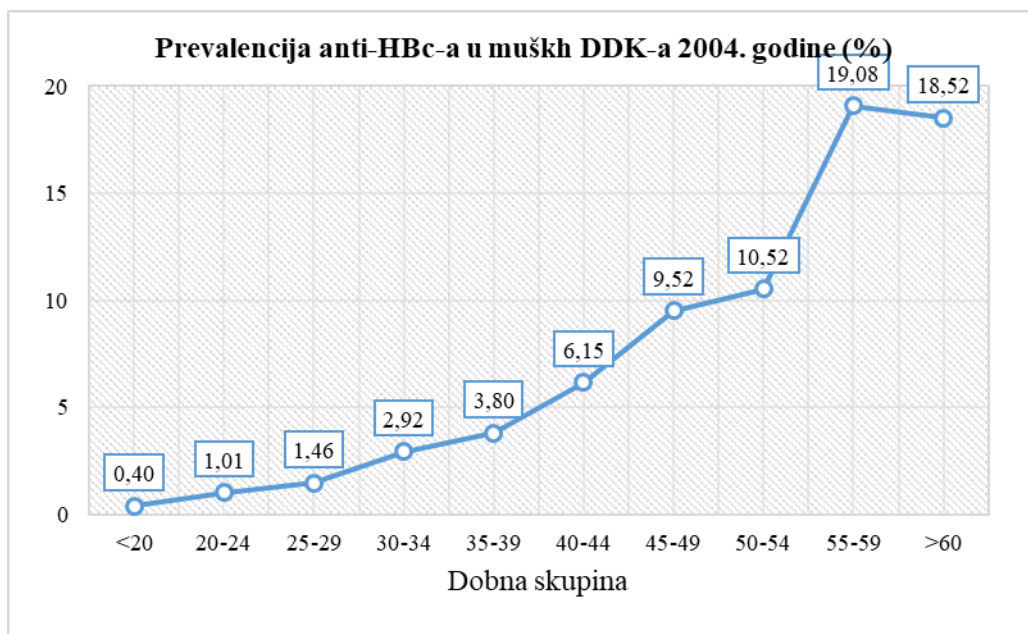
3.3.3. PREVALENCIJA ANTI-HBc-a PREMA SPOLU DDK-a

3.3.3.1. Prevalencija anti-HBc-a u muških DDK-a

Prevalencija anti-HBc-a u muških DDK-a po dobnim skupinama prikazana je u *tablici 3.4.*, te na *slici 3.6.* za 2004. godinu, na *slici 3.7.* za 2013. godinu i na *slici 3.8.* za 2017. godinu. Za sve tri godine prevalencija anti-HBc-a prikazana je na *slici 3.9.*

Tablica 3.4. Prevalencija anti-HBc-a u muških DDK-a po dobnim skupinama

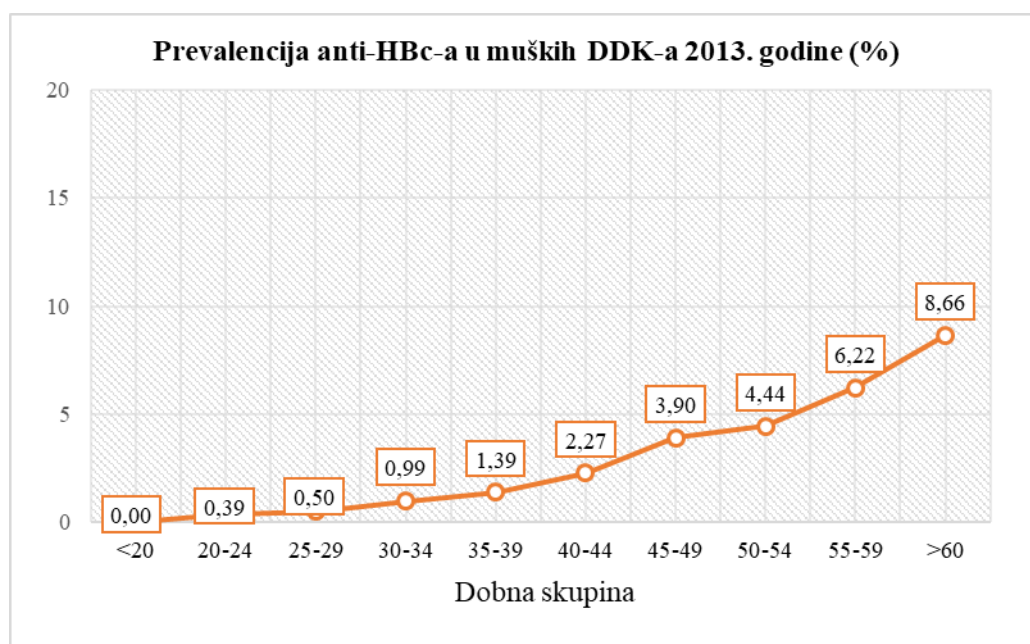
Anti-HBc prevalencija u muških DDK-a (%)					
Dobna skupina	2004.	2013.	2017.	P	χ^2
<20	0,40	0,00	0,00		
20-24	1,01	0,39	0,00		
25-29	1,46	0,50	0,00		
30-34	2,92	0,99	0,17	<0,001	21,45
35-39	3,80	1,39	0,33	<0,001	26,11
40-44	6,15	2,27	1,18	<0,001	30,10
45-49	9,52	3,90	1,01	<0,001	16,90
50-54	10,52	4,44	2,58	<0,001	80,22
55-59	19,08	6,22	4,14	<0,001	23,98
>60	18,52	8,66	6,77	<0,001	21,35
Ukupno	5,38	2,61	1,31	<0,001	21,15



Slika 3.6. Prevalencija anti-HBc-a u muških DDK-a u 2004. godini

Apscisa predstavlja dobne skupine muških DDK-a iz 2004. godine, a ordinata prevalencije anti-HBc-a u postocima (%). U pravokutnicima su prikazane izračunate prevalencije anti-HBc-a u postocima (%) po dobnim skupinama.

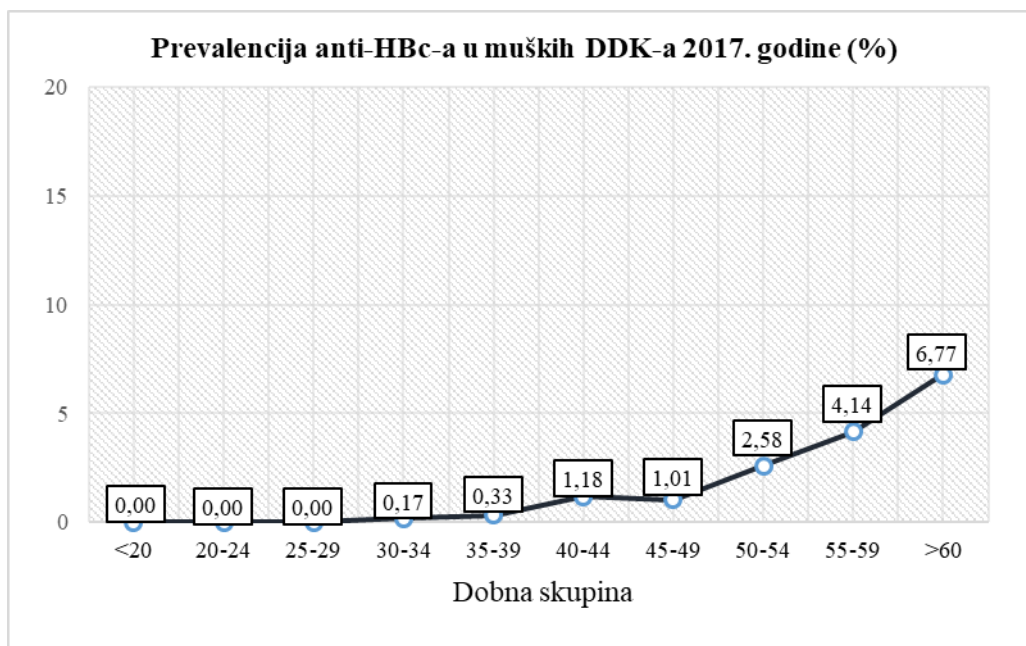
Ispitano je 6249 uzoraka krvi muških DDK-a iz 2004. godine. Prevalencija anti-HBc-a rasla je sa starošću DDK-a, i najniža je bila u DDK-ima mlađih od 20 godina, 0,40 %, a najviša u dobnoj skupini od 55 do 59 godina, 19,08 %.



Slika 3.7. Prevalencija anti-HBc-a u muških DDK-a u 2013. godini

Apscisa predstavlja dobne skupine muških DDK-a iz 2013. godine, a ordinata prevalencije anti-HBc-a u postocima (%). U pravokutnicima su prikazane izračunate prevalencije anti-HBc-a u postocima (%) po dobnim skupinama.

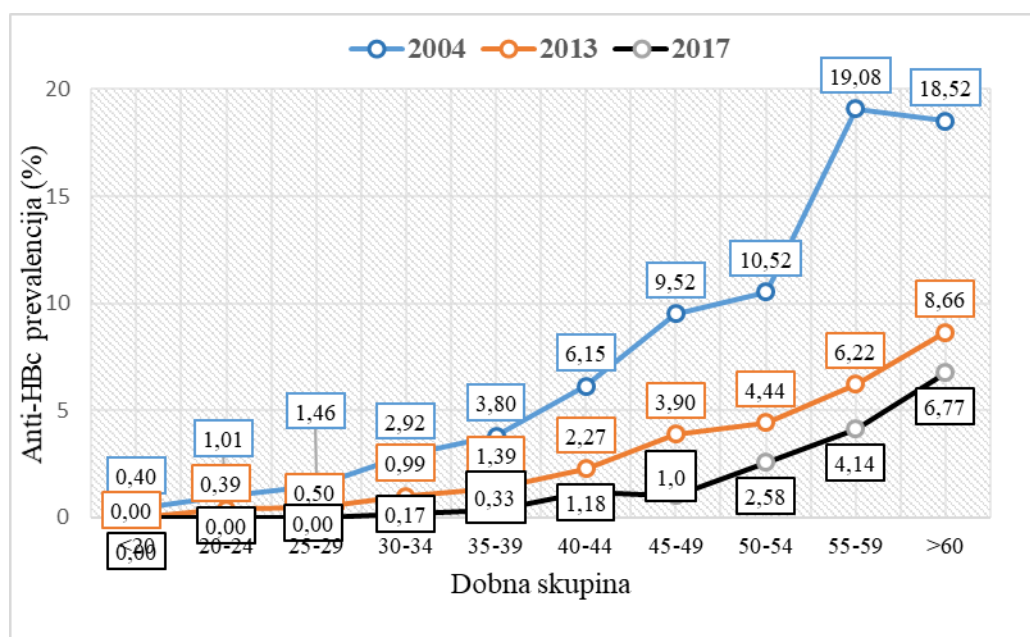
Ispitano je 6362 uzoraka krvi muških DDK-a iz 2013. godine. Prevalencija anti-HBc-a rasla je sa starošću DDK-a. U muških DDK-a mlađih od 20 godina nije bilo anti-HBc pozitivnih, dok je anti-HBc prevalencija u skupini DDK-a od 20 do 24 godine bila najniža, 0,39 %, a najviša u onih starijih od 60 godina, 8,66 %.



Slika 3.8. Prevalencija anti-HBc-a u muških DDK-a u 2017. godini

Apscisa predstavlja dobne skupine muških DDK-a iz 2017. godine, a ordinata prevalencije anti-HBc-a u postocima (%). U pravokutnicima su prikazane izračunate prevalencije anti-HBc-a u postocima (%) po dobnim skupinama.

Ispitano je 6362 uzoraka krvi muških DDK-a iz 2017. godine. Prevalencija anti-HBc-a rasla je sa starošću DDK-a. U muških DDK-a mlađih od 30 godina nije bilo anti-HBc pozitivnih, dok je anti-HBc prevalencija u skupini DDK-a od 30 do 34 godine bila najniža, 0,17 %, a najviša u onih starijih od 60 godina, 6,77 %.



Slika 3.9. Prevalencija anti-HBc-a u muških DDK-a za tri ispitne godine

Apscisa predstavlja dobne skupine muških DDK-a, a ordinata prevalencije anti-HBc-a u postocima (%). U pravokutnicima su prikazane izračunate prevalencije anti-HBc-a u postocima (%) po dobnim skupinama DDK-a iz 2004., 2013. i 2017. godine.

Zaključci

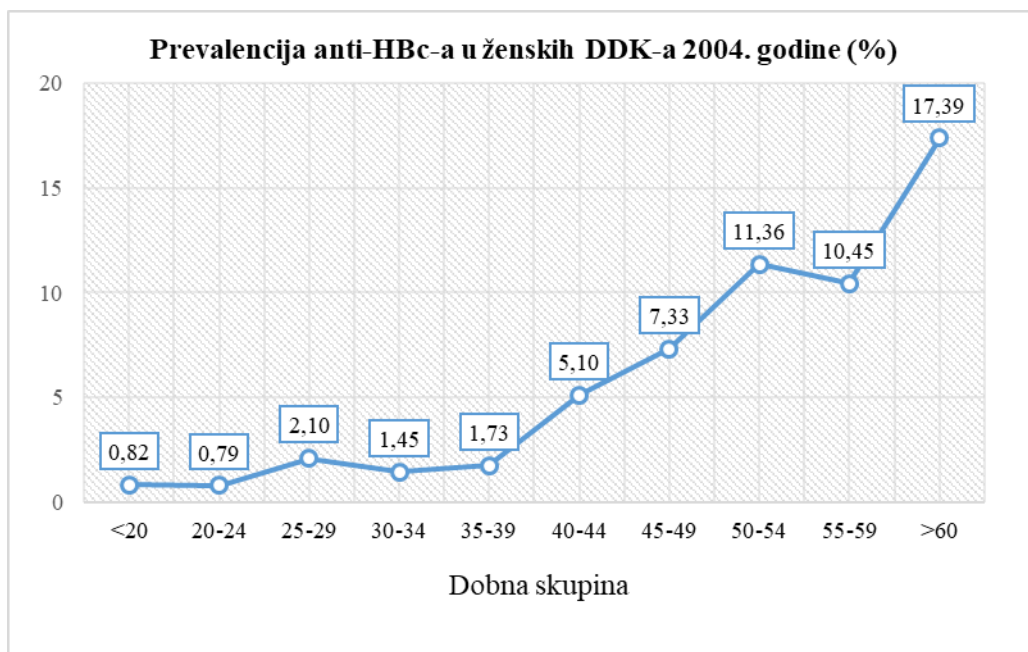
1. Utvrđen je statistički značajan pad prevalencije anti-HBc-a u svim dobnim skupinama muških DDK-a u sve tri ispitne godine.
2. Najveći pad prevalencije anti-HBc-a u 2013. godini zabilježen je u dobnoj skupini muških DDK-a od 50 do 60 godina starosti, a statistički značajan u skupinama preko 30 godina starosti ($P < 0,05$)
3. 2017. godine statistički značajan pad prevalencije ($P < 0,05$) u odnosu na 2013. godinu zabilježen je u svim dobnim skupinama muških DDK-a preko 20 godina starosti.

3.3.3.2. Prevalencija anti-HBc-a u ženskih DDK-a

Prevalencija anti-HBc-a u ženskih DDK-a po dobnim skupinama prikazana je u *tablici 3.5.*, te na *slici 3.10.* za 2004. godinu, na *slici 3.11.* za 2013. godinu i na *slici 3.12.* za 2017. godinu. Za sve tri godine prevalencija anti-HBc-a prikazana je na *slici 3.13.*

Tablica 3.5. Prevalencija anti-HBc-a u ženskih DDK-a po dobnim skupinama

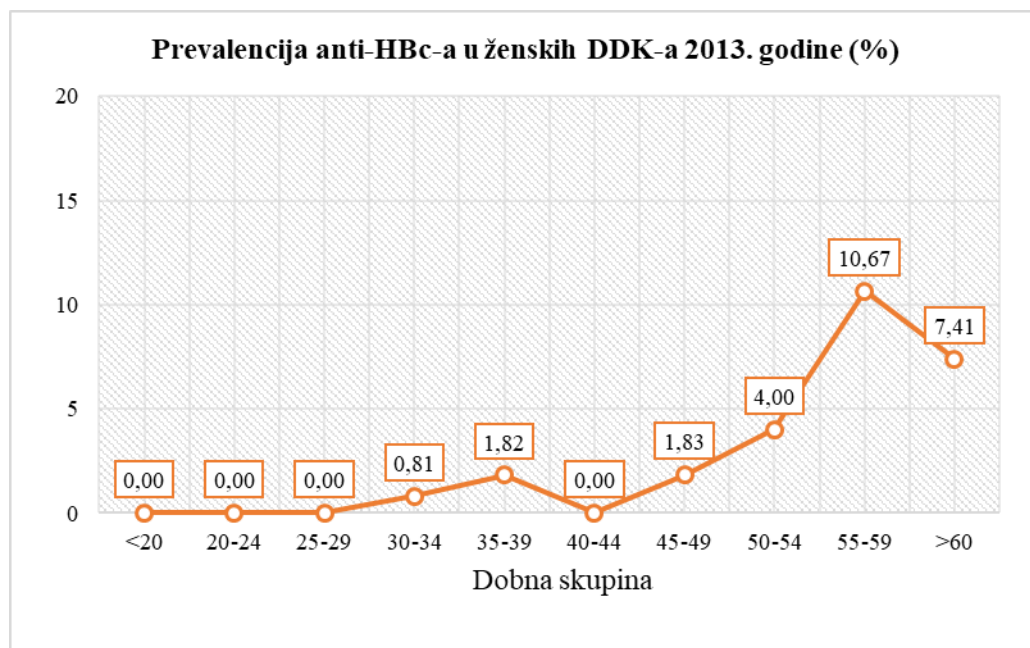
Anti-HBc prevalencija u ženskih DDK-a (%)					
Dobna skupina	2004.	2013.	2017.	P	χ^2
<20	0,82	0,00	0,00		
20-24	0,79	0,00	0,00		
25-29	2,10	0,00	1,11	0,001	10,66
30-34	1,45	0,81	0,00	0,01	6,62
35-39	1,73	1,82	1,23	0,317	1,002
40-44	5,10	0,00	1,27	0,0005	12
45-49	7,33	1,83	2,00	0,795	0,07
50-54	11,36	4,00	0,00	<0,001	33,18
55-59	10,45	10,67	5,56	0,0001	15,07
>60	17,39	7,41	5,66	0,140	2,18
Ukupno	4,57	2,20	1,48	0,265	1,24



Slika 3.10. Prevalencija anti-HBc-a u ženskih DDK-a u 2004. godini

Apscisa predstavlja dobne skupine ženskih DDK-a iz 2004. godine, a ordinata prevalencije anti-HBc-a u postocima (%). U pravokutnicima su prikazane izračunate prevalencije anti-HBc-a u postocima (%) po dobnim skupinama.

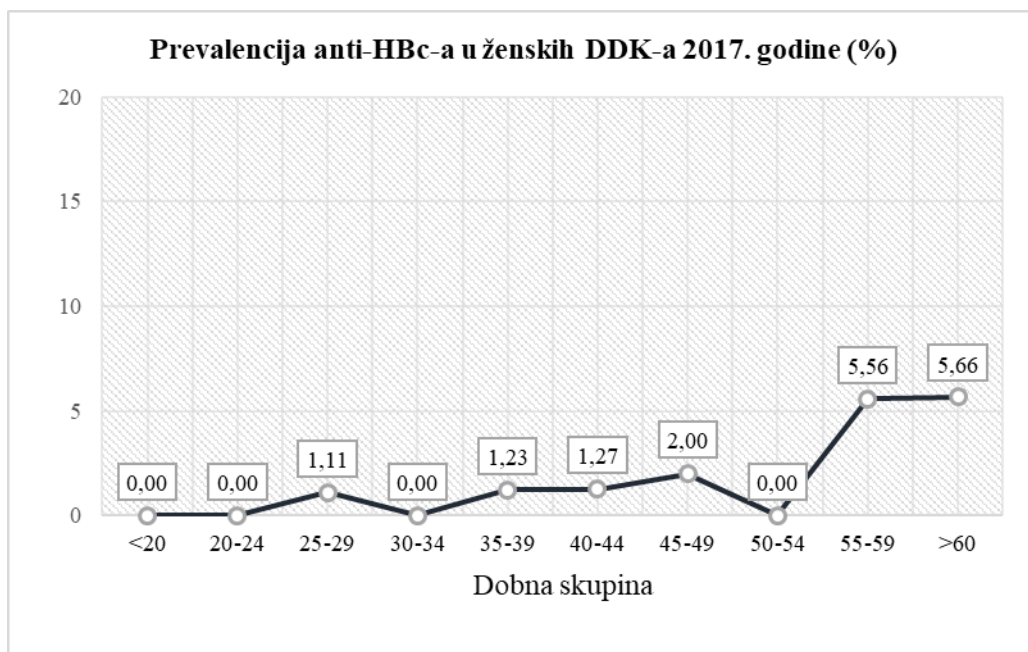
Ispitano je 1312 uzoraka krvi ženskih DDK-a iz 2004. godine. Prevalencija anti-HBc-a rasla je sa starošću DDK-a, i najniža je bila u ženskih DDK-a mlađih od 20 godina, 0,82 %, a najviša u onih starijih od 60 godina, 17,39 %.



Slika 3.10. Prevalencija anti-HBc-a u ženskih DDK-a u 2013. godini

Apscisa predstavlja dobne skupine ženskih DDK-a iz 2013. godine, a ordinata prevalencije anti-HBc-a u postocima (%). U pravokutnicima su prikazane izračunate prevalencije anti-HBc-a u postocima (%) po dobnim skupinama.

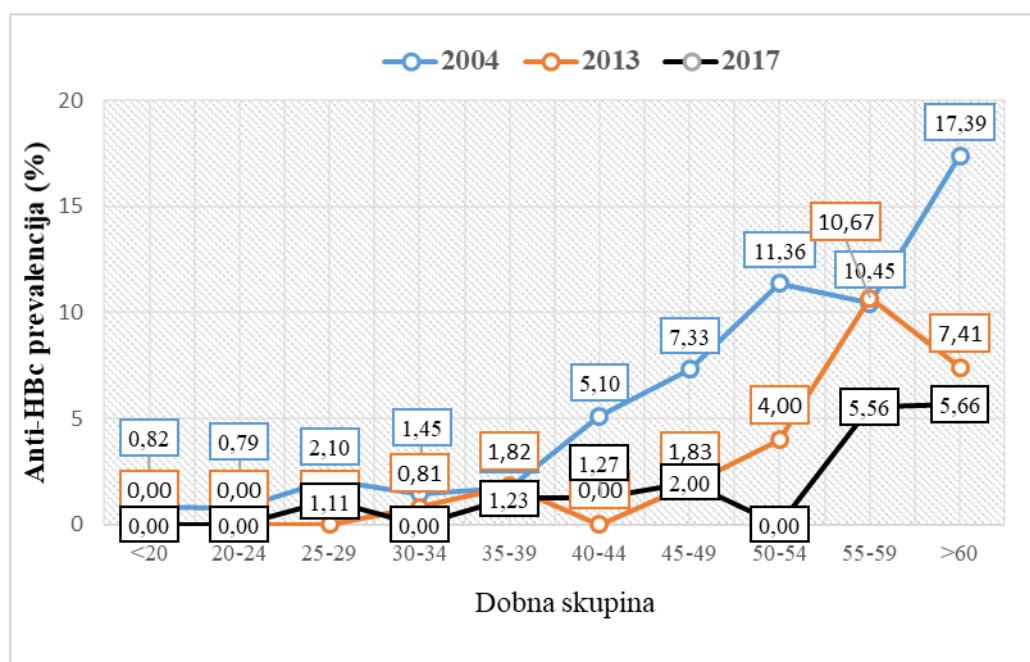
Ispitano je 956 uzoraka krvi ženskih DDK-a iz 2013. godine. Prevalencija anti-HBc-a rasla je sa starošću DDK-a. U ženskih DDK-a mlađih od 30 godina nije bilo anti-HBc pozitivnih, dok je anti-HBc prevalencija u skupini DDK-a od 30 do 34 godine bila najniža, 0,81 %, a najviša u dobnoj skupini od 55 do 59 godina, 10,67 %.



Slika 3.12. Prevalencija anti-HBc-a u ženskih DDK-a u 2017. godini

Apscisa predstavlja dobne skupine ženskih DDK-a iz 2017. godine, a ordinata prevalencije anti-HBc-a u postocima (%). U pravokutnicima su prikazane izračunate prevalencije anti-HBc-a u postocima (%) po dobnim skupinama.

Ispitano je 812 uzoraka krvi ženskih DDK-a iz 2017. godine. Prevalencija anti-HBc-a ne prati linearan porast sa starošću DDK-a. U ženskih DDK-a mlađih od 24 godina, u dobnoj skupini od 30 do 34 godine te od 50 do 54 godine starosti nije bilo anti-HBc pozitivnih. Najviša anti-HBc prevalencija bila je u ženskih DDK-a starijih od 60 godina, 5,66 %.



Slika 3.13. Prevalencija anti-HBc-a u ženskih DDK-a za tri ispitne godine

Apscisa predstavlja dobne skupine ženskih DDK-a, a ordinata prevalencije anti-HBc-a u postocima (%). U pravokutnicima su prikazane izračunate prevalencije anti-HBc-a u postocima (%) po dobnim skupinama DDK-a iz 2004., 2013. i 2017. godine.

Zaključci

1. Statistički značajan pad prevalencije anti-HBc-a u ženskih DDK-a nije utvrđen u dobnim skupinama od 35 do 39 godina, od 45 do 49 godina te u starijih od 60 godina, dok je u svim ostalim dobnim skupinama utvrđen.
2. Pad prevalencije anti-HBc-a 2013. godine u odnosu na 2004. godine zabilježen je samo u dobnoj skupini od 40 do 44 godina starosti ($P=0,03$), dok je u dobnim skupinama od 45 do 49 i od 50 do 54 godina starosti razlika u prevalenciji skoro statistički značajna, $P=0,07$ i $P=0,06$.
3. Ukupan pad prevalencije anti-HBc-a u ženskih DDK-a 2017. godine u odnosu na 2013. godinu nije statistički značajan ($\chi^2=1,24$; $P=0,265$), osim u dobnim skupinama od 25 do 34, od 40 do 44 i od 50 do 59 godina starosti ($P<0,05$).

3.3.4. PREVALENCIJA ANTI-HBc-a U ISPITANIH DDK-a PREMA

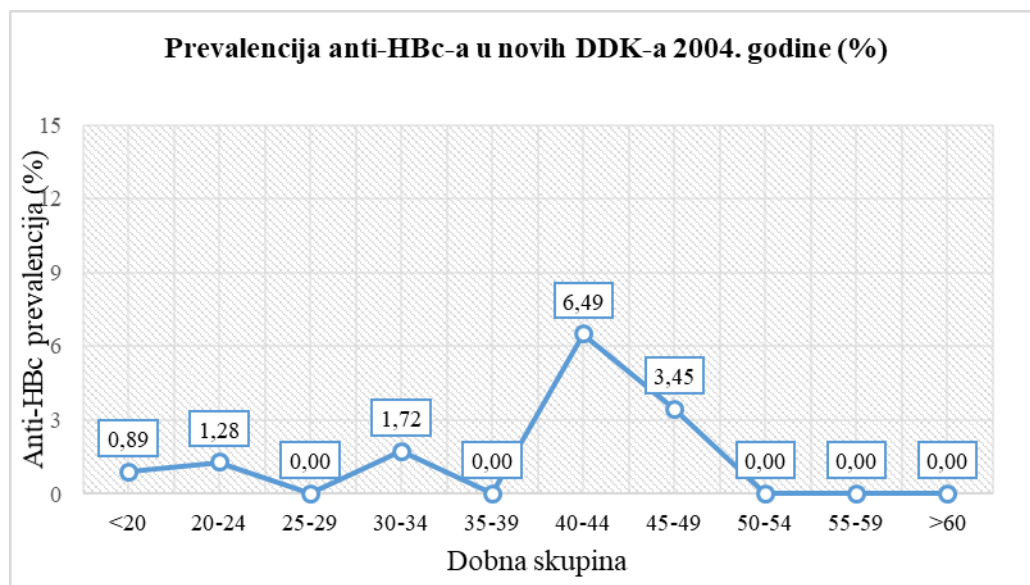
BROJU DAVANJA KRV

3.3.4.1. Prevalencija anti-HBc-a u novih DDK-a

Prevalencija anti-HBc-a u novih DDK-a, tj. onih koji su prvi puta davali krv, prikazana je u *tablici 3.6.*, te na *slici 3.14.* za 2004. godinu, na *slici 3.15.* za 2013. godinu i na *slici 3.16.* za 2017. godinu. Za sve tri godine prevalencija anti-HBc-a prikazana je na *slici 3.17.*

Tablica 3.6. Prevalencija anti-HBc-a u novih DDK-a po dobnim skupinama

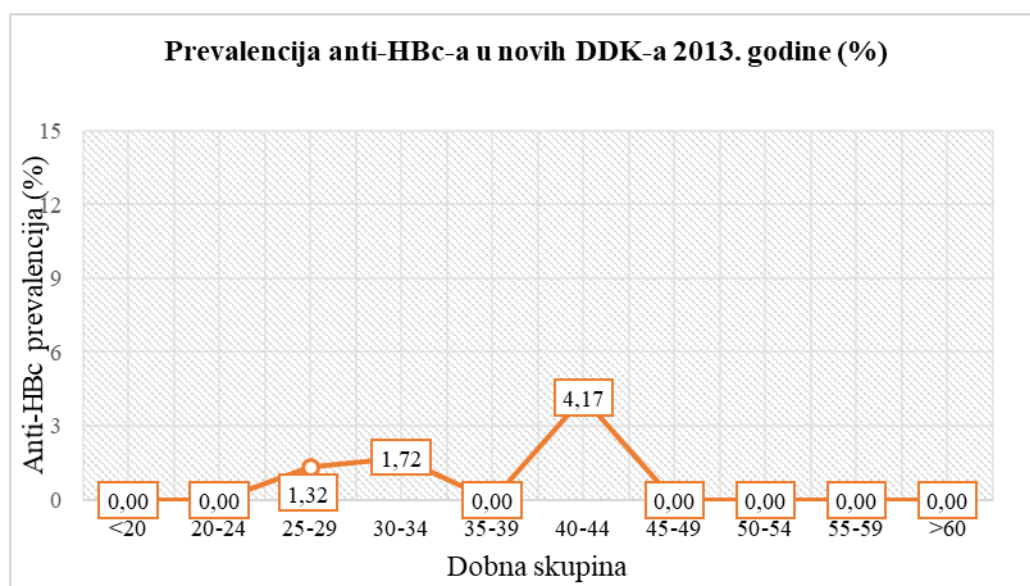
Anti-HBc prevalencija u novih DDK-a (%)			
Dobna skupina	2004.	2013.	2017.
<20	0,89	0,00	0,00
20-24	1,28	0,00	0,00
25-29	0,00	1,32	0,00
30-34	1,72	1,72	0,00
35-39	0,00	0,00	5,88
40-44	6,49	4,17	0,00
45-49	3,45	0,00	0,00
50-54	0,00	0,00	0,00
55-59	0,00	0,00	0,00
>60	0,00	0,00	0,00
Ukupno	1,37	0,88	0,32



Slika 3.14. Prevalencija anti-HBc-a u novih DDK-a u 2004. godini

Apscisa predstavlja dobne skupine novih DDK-a iz 2004. godine, a ordinata prevalencije anti-HBc-a u postocima (%). U pravokutnicima su prikazane izračunate prevalencije anti-HBc-a u postocima (%) po dobnim skupinama.

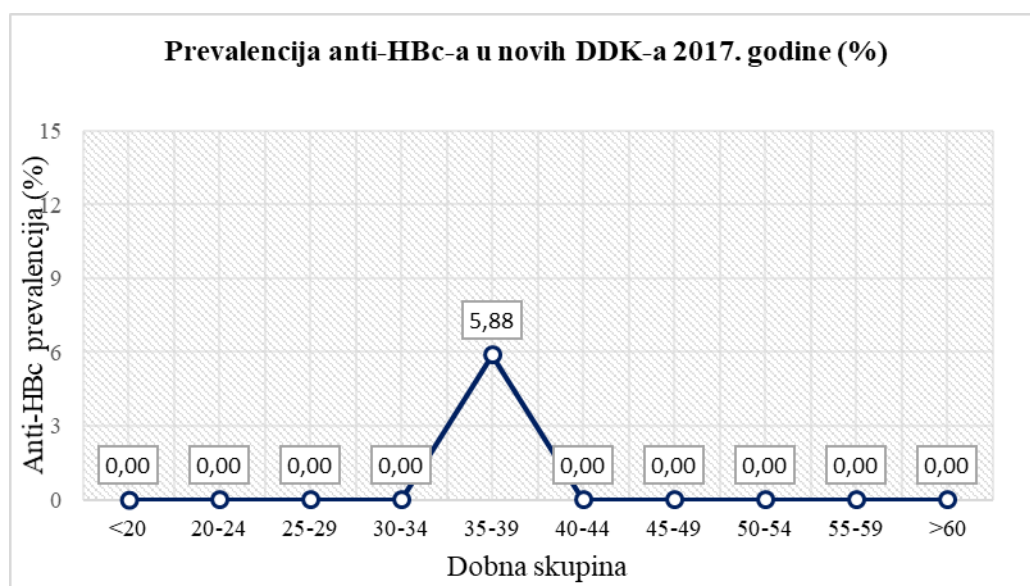
Ispitano je 1098 uzoraka krvi novih DDK-a iz 2004. godine. U dobnim skupinama novih DDK-a od 25 do 29 godina, od 35 do 39 godina te od 50 godina starosti nije bilo anti-HBc pozitivnih DDK-a. Najviša anti-HBc prevalencija je bila u dobnoj skupini od 40 do 44 godina, 6,49 %.



Slika 3.15. Prevalencija anti-HBc-a u novih DDK-a u 2013. godini

Apscisa predstavlja dobne skupine novih DDK-a iz 2013. godine, a ordinata prevalencije anti-HBc-a u postocima (%). U pravokutnicima su prikazane izračunate prevalencije anti-HBc-a u postocima (%) po dobnim skupinama.

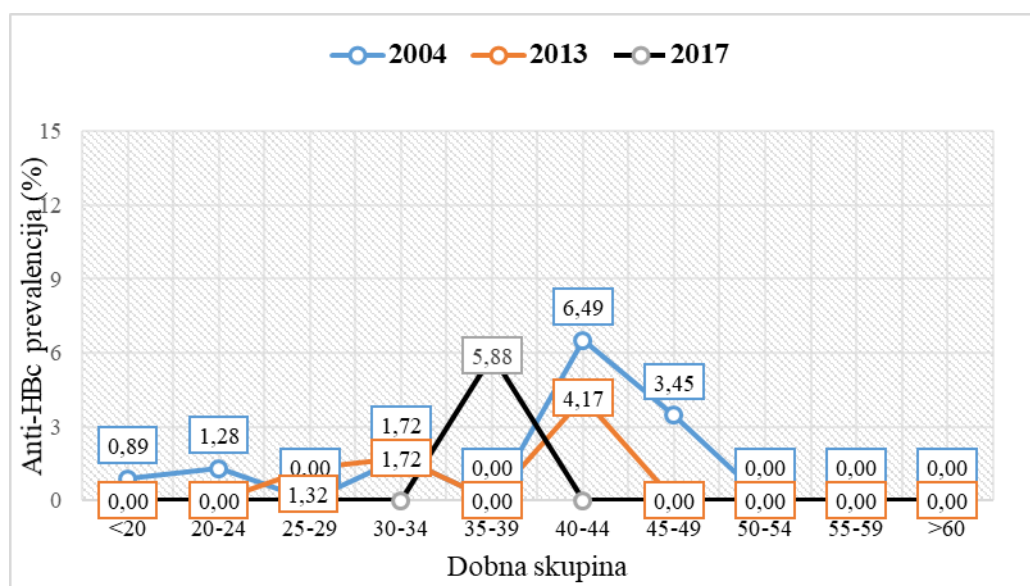
Ispitano je 340 uzoraka krvi novih DDK-a iz 2013. godine. Gotovo u svim dobnim skupinama nije bilo anti-HBc pozitivnih DDK-a, osim u dobnim skupinama: od 25 do 34 godina te od 40 do 44 godina. Najviša anti-HBc prevalencija nađena je u dobnjoj skupini od 40 do 44 godina starosti.



Slika 3.16. Prevalencija anti-HBc-a u novih DDK-a u 2017. godini

Apscisa predstavlja dobne skupine novih DDK-a iz 2017. godine, a ordinata prevalencije anti-HBc-a u postocima (%). U pravokutnicima su prikazane izračunate prevalencije anti-HBc-a u postocima (%) po dobnim skupinama.

Ispitano je 310 uzoraka krvi novih DDK-a iz 2017. godine. Jedino je u dobnoj skupini od 35 do 39 godina utvrđena prevalencija anti-HBc-a od 5,88 %, dok u svim ostalim dobnim skupinama nije bilo anti-HBc pozitivnih novih DDK-a.



Slika 3.17. Prevalencija anti-HBc-a u novih DDK-a za tri ispitne godine

Apscisa predstavlja dobne skupine novih DDK-a, a ordinata prevalencije anti-HBc-a u postocima (%). U pravokutnicima su prikazane izračunate prevalencije anti-HBc-a u postocima (%) po dobnim skupinama DDK-a iz 2004., 2013. i 2017. godine.

Zaključci

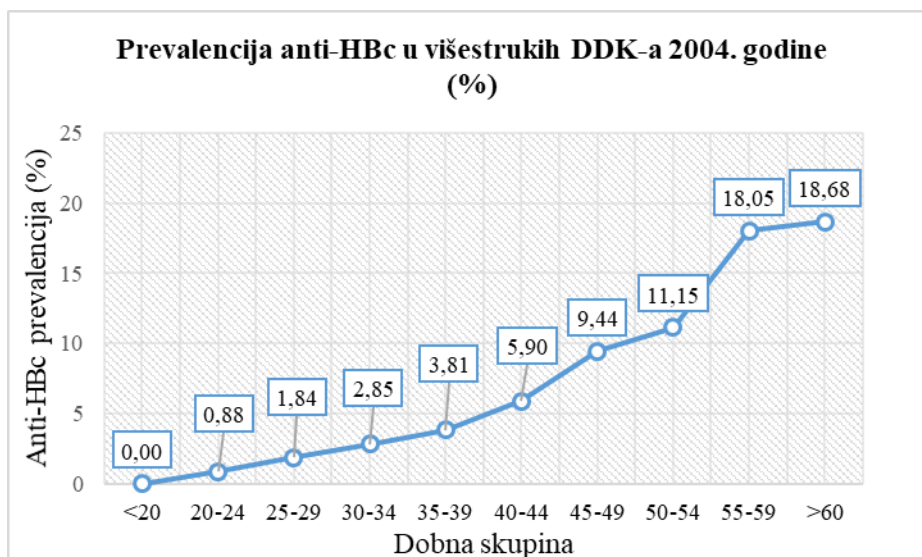
1. Ukupan pad prevalencije anti-HBc-a u novih DDK-a 2013. godine u odnosu na 2004. godinu nije statistički značajan ($P=0,493$), osim u dobnoj skupini od 20 do 24 ($P=0,036$) i od 45 do 49 godina starosti ($P=0,005$). Međutim, utvrđen je statistički značajan porast prevalencije 2013. godine u dobnoj skupini od 25 do 29 godina starosti ($P=0,001$).
2. Ukupan pad prevalencije anti-HBc-a u novih DDK-a u 2017. godini u odnosu na 2013. godinu nije statistički značajan ($\chi^2=0,83$; $P=0,361$), osim u dobnim skupinama od 25 do 34 ($P=0,002$) i od 40 do 44 godina starosti ($P=0,003$). Međutim, utvrđen je statistički značajan porast prevalencije 2017. godine u dobnoj skupini od 35 do 39 godina starosti ($P<0,001$).

3.3.4.2. Prevalencija anti-HBc-a u višestrukih DDK-a

Prevalencija anti-HBc-a u višestrukih DDK-a, tj. onih koji su dali krv dva puta ili više, prikazana je u *tablici 3.7.*, te na *slici 3.18.* za 2004. godinu, na *slici 3.19.* za 2013. godinu i na *slici 3.20.* za 2017. godinu. Za sve tri godine prevalencija anti-HBc-a prikazana je na *slici 3.21.*

Tablica 3.7. Prevalencija anti-HBc-a u višestrukih DDK-a po dobnim skupinama

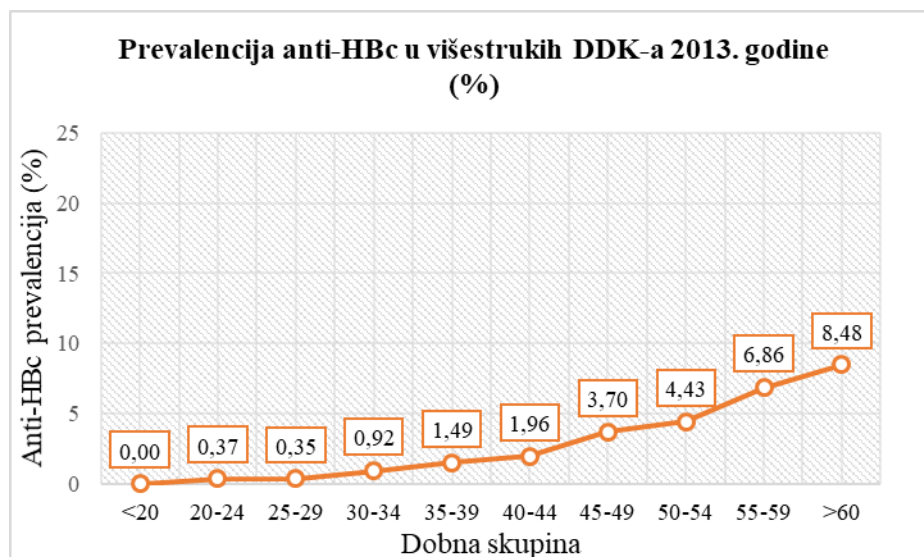
Anti-HBc prevalencija u višestrukih DDK-a (%)					
Dobna skupina	2004.	2013.	2017.	P	χ^2
<20	0,00	0,00	0,00		
20-24	0,88	0,37	0,00	<0,0001	17,72
25-29	1,84	0,35	0,17	<0,068	3,32
30-34	2,85	0,92	0,15	<0,0001	27,87
35-39	3,81	1,49	0,29	<0,0001	41,17
40-44	5,90	1,96	1,20	0,015	10,09
45-49	9,44	3,70	1,03	<0,0001	79,41
50-54	11,15	4,43	2,20	<0,0001	41,49
55-59	18,05	6,86	4,44	<0,0001	23,55
>60	18,68	8,48	6,60	<0,0001	13,93
Ukupno	5,90	2,64	1,38	<0,0001	22,79



Slika 3.18. Prevalencija anti-HBc-a u višestrukih DDK-a u 2004. godini

Apscisa predstavlja dobne skupine višestrukih DDK-a iz 2004. godine, a ordinata prevalencije anti-HBc-a u postocima (%). U pravokutnicima su prikazane izračunate prevalencije anti-HBc-a u postocima (%) po dobnim skupinama.

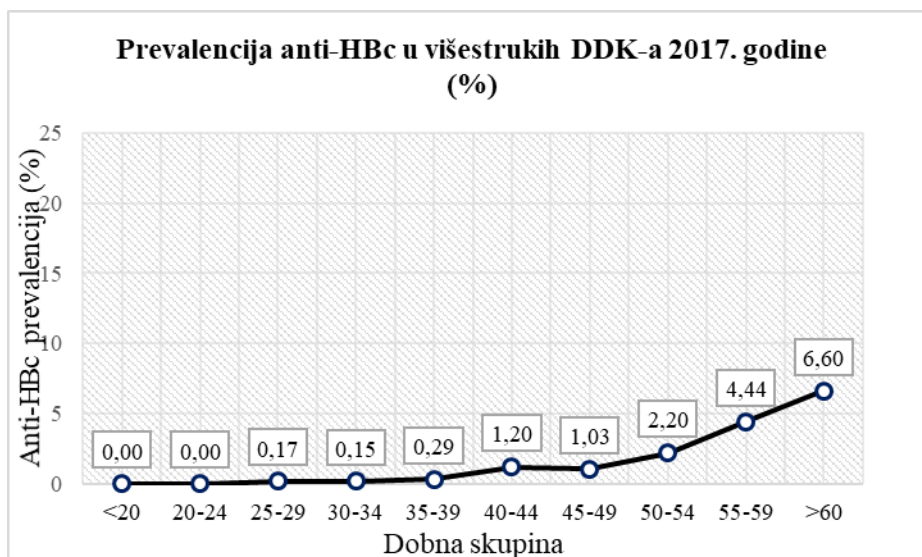
Ispitano je 6463 uzoraka krvi višestrukih DDK-a iz 2004. godine. Prevalencija anti-HBc-a rasla je sa starošću DDK-a. U višestrukih DDK-a mlađih od 20 godina nije bilo anti-HBc pozitivnih, dok je anti-HBc prevalencija u skupini DDK-a od 20 do 24 godine bila najniža, 0,88 %, a najviša u onih starijih od 60 godina, 18,68 %.



Slika 3.19. Prevalencija anti-HBc-a u višestrukih DDK-a u 2013. godini

Apscisa predstavlja dobne skupine višestrukih DDK-a iz 2013. godine, a ordinata prevalencije anti-HBc-a u postocima (%). U pravokutnicima su prikazane izračunate prevalencije anti-HBc-a u postocima (%) po dobnim skupinama.

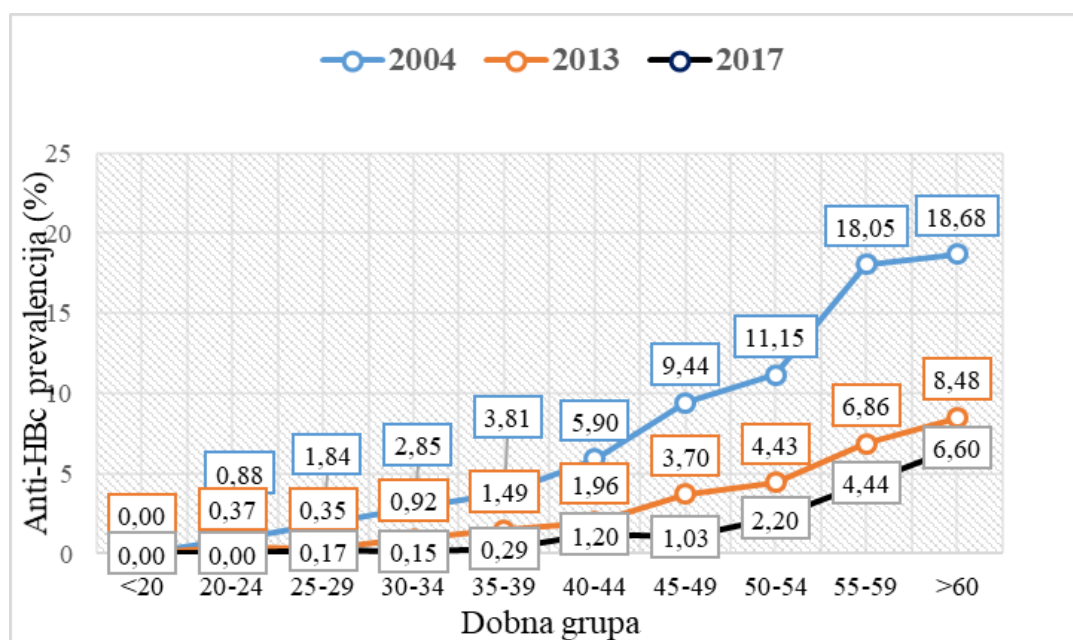
Ispitano je 6978 uzoraka krvi višestrukih DDK-a iz 2013. godine. Prevalencija anti-HBc-a rasla je sa starošću DDK-a. U višestrukih DDK-a mlađih od 20 godina nije bilo anti-HBc pozitivnih. Anti-HBc prevalencija kretala se od 0,35 % do 8,48 %, u višestrukih DDK-a starijih od 60 godina.



Slika 3.20. Prevalencija anti-HBc-a u višestrukih DDK-a u 2017. godini

Apscisa predstavlja dobne skupine višestrukih DDK-a iz 2017. godine, a ordinata prevalencije anti-HBc-a u postocima (%). U pravokutnicima su prikazane izračunate prevalencije anti-HBc-a u postocima (%) po dobnim skupinama.

Ispitano je 4780 uzoraka krvi višestrukih DDK-a iz 2017. godine. Prevalencija anti-HBc-a rasla je sa starošću DDK-a. U višestrukih DDK-a mlađih od 24 godina nije bilo anti-HBc pozitivnih. Anti-HBc prevalencija kretala se od 0,15 % do 6,60 %, u višestrukih DDK-a starijih od 60 godina.



Slika 3.21. Prevalencija anti-HBc-a u višestrukih DDK-a za tri ispitne godine

Apscisa predstavlja dobne skupine višestrukih DDK-a, a ordinata prevalencije anti-HBc-a u postocima (%). U pravokutnicima su prikazane izračunate prevalencije anti-HBc-a u postocima (%) po dobnim skupinama DDK-a iz 2004., 2013. i 2017. godine.

Zaključci

1. Utvrđen je statistički značajan pad prevalencije anti-HBc-a u svim dobnim skupinama višestrukih DDK-a u sve tri ispitne godine ($P < 0,0001$).
2. Statistički značajan pad prevalencije anti-HBc-a u 2013. godini zabilježen je u svim dobnim skupinama višestrukih DDK-a ($P < 0,005$), osim u dobnjoj skupini od 20 do 24 godine starosti ($\chi^2 = 1,21$; $P = 0,27$).
3. 2017. godine statistički značajan pad prevalencije ($P < 0,05$) u odnosu na 2013. godinu zabilježen je u svim dobnim skupinama višestrukih DDK-a.

3.3.5. SKUPNI PRIKAZ UTVRĐENE ANTI-HBc PREVALENCIJE PO SVIM SKUPINAMA ISPITANIH DDK-a

U tablici 3.8. (preuzeto iz Miletić i sur., 2019; uz suglasnost nakladnika) prikazani su ukupni rezultati anti-HBc prevalencije ispitanih DDK-a po ispitnim godinama te spolu i broju davanja krvi.

Tablica 3.8. Prevalencija anti-HBc-a u ispitivanim skupinama DDK-a u 2013., 2014. i 2017. godini

Prevalencija anti-HBc-a (%) (95 %CI) po različitim skupinama ispitanih DDK-a							
Godina	Prevalencija Anti-HBc Anti-HBc-only	ND		VD		Ž	M
2004.	396/7561 5,24 (4,76-5,77)	1,37 (0,83-2,25)		5,90 (5,35-6,50)		4,57 (3,57-5,84)	5,38 (4,85-5,97)
	47/7561 0,62 (0,47-0,82)	Ž 1.43 (0,61-3,30)	M 1.34 (0,73-2,45)	Ž 5.72 (4,42-7,37)	M 5.93 (5,34-6,59)		
2013.	187/7318 2,56 (2,22-2,95)	0,88 (0,30-2,56)		2,64 (2,29-3,04)		2,20 (1,44-3,34)	2,61 (2,05-3,03)
	18/7318 0,25 (0,16-0,39)	Ž 0,0 (0,00-2,56)	M 1,55 (0,53-4,45)	Ž 2,59 (1,70-3,93)	M 2,64 (2,27-3,07)		
2017.	67/5090 1,32 (1,04-1,67)	0,32 (0,06-1,80)		1,38 (1,09-1,75)		1,48 (0,85-2,57)	1,31 (1,01-1,70)
	11*/5090 0,21 (0,12-0,39)						

ND= novi DDK; VD= višestruki DDK; Ž= ženski DDK; M= muški DDK

*Anti-HBc-only- DDK kojima je određena prisutnost samo anti-HBc-a, bez ostalih HBV biljega

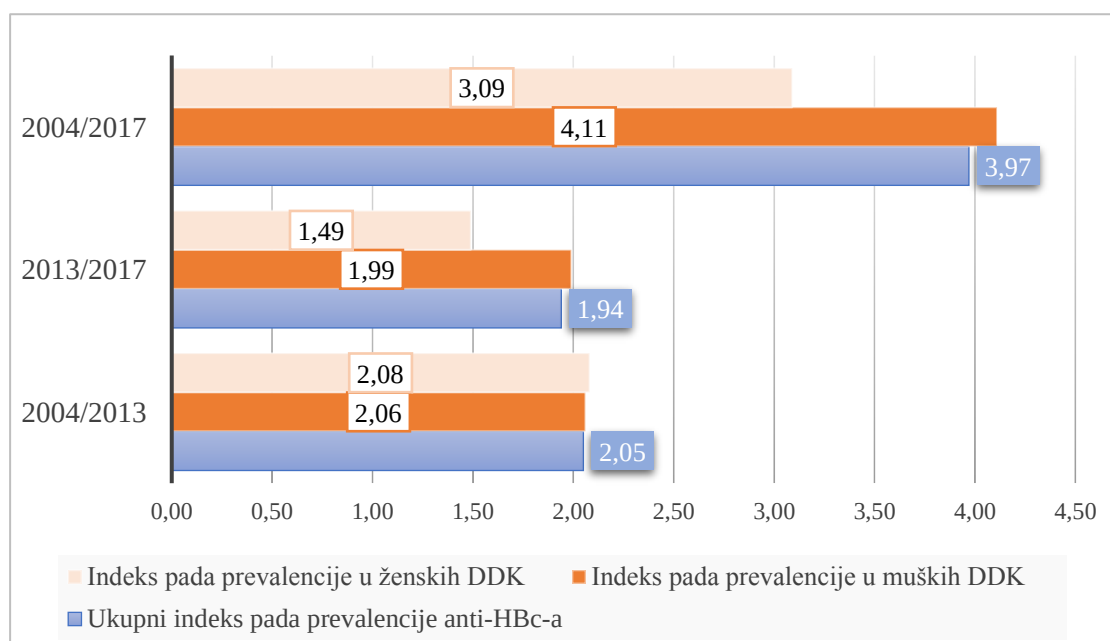
Zaključci

1. Utvrđen je pad prevalencije anti-HBc-a u sve tri ispitne godine i u svim dobim skupinama DDK-a.
2. Statistički je značajan pad prevalencije anti-HBc-a 2013. godine u odnosu na 2004. godinu s 5,24 % na 2,56 % ($P<0,001$), kao i 2017. u odnosu na 2013. godinu s 2,56 % na 1,32 % ($P<0,001$).
3. Razlika u anti-HBc prevalenciji 2013. godine u odnosu na 2004. godinu uvjetovana je padom prevalencije u višestrukih davatelja krvi s 5,90 % na 2,64 % ($P<0,001$), dok je pad prevalencije anti-HBc-a 2017. godinu u odnosu na 2013. godinu temeljen na značajnom padu prevalencije u višestrukih s 2,64 % na 1,38 % ($P<0,004$) i novih davatelja krvi s 0,88 % na 0,32 % ($P<0,001$).
4. Utvrđen je statistički značajan pad prevalencije anti-HBc-a u svim dobnim skupinama muških DDK-a u sve tri ispitne godine, međutim u ženskih DDK-a nije utvrđen u svim dobnim skupinama i to: od 35 do 39 godina, od 45 do 49 godina te u starijih od 60 godina.

3.4. INDEKS PADA PREVALENCIJE ANTI-HBc-A U POPULACIJI

DDK-a U ISPITIVANOM RAZDOBLJU

U vremenskom razdoblju od 14 godina prevalencija anti-HBc-a u ispitivanoj populaciji DDK-a pala je 3,97 puta, (4,11 u muških i 3,09 u ženskih). Zanimljivo je da je indeks pada prevalencije 2013./2017. od 1,94 gotovo dosegao indeks pada od 2,05 postignut u 9 godišnjem periodu 2004./2013., *slika 3.22.* (preuzeto iz Miletić i sur., 2019; uz suglasnost nakladnika). Najveći indeks pada prevalencije zabilježen je u dobnim skupinama od 25 do 40 godina starosti (10-18 puta). Indeks pada prevalencije veći je u muških DDK-a 2004. i 2013. godine nego u ženskih DDK-a, a podjednak 2017. godine.



Slika 3.22. Indeks pada prevalencije anti-HBc-a u ispitivanom razdoblju

Apscisa predstavlja indeks pada anti-HBc prevalencije u populaciji DDK-a, a ordinata usporedne godine istraživanja. U pravokutnicima su prikazani izračunati indeksi pada anti-HBc prevalencije.

3.5. PREVALENCIJA ANTI-HBc-ONLY POZITIVNIH DDK-a

Prevalencija anti-HBc-only pozitivnih davatelja, odnosno DDK-a kojima je od HBV biljega utvrđena prisutnost samo anti-HBc-a (a svi ostali biljezi negativni), ispitanih u 2004. godini bila je 0,62 %, a u 2013. godini 0,25 %, ($P=0,0006$) što predstavlja značajan pad. Prevalencija anti-HBc-only pozitivnih DDK-a u 2017. godini je 0,21 % i upućuje na daljnji padajući trend, iako nije statistički značajan pad u odnosu na 2013. godinu ($P<0,650$).

Udio anti-HBc-only među anti-HBc pozitivnima od 11,8 % 2004. i 9,6 % 2013. godine ne razlikuje se značajno ($P=0,497$) / ($P=0,134$), prikazano u *tablici 3.9*. Anti-HBc-only pozitivnih davatelja među anti-HBc pozitivnima u 2004. godini bilo je i u davatelja mlađih od 30 godina, dok u 2013. i 2017. godini ovaj tip reaktivnosti nisu pokazivali davatelji mlađi od 35 godina.

Budući da anti-HBc pozitivni DDK-i iz 2017. godine nisu ispitani na anti-HBe, u *tablici 3.9*. u koloni anti-HBc-only prikazani su svi anti-HBc pozitivni, s negativnim nalazom anti-HBs-a i anti-HBc IgM-a.

Tablica 3.9. Udio anti-HBc-only pozitivnih DDK-a među anti-HBc pozitivnima

Dobna skupina DDK	2004.			2013.			2017.		
	n a-HBc-only +	n anti-HBc +	%	n a-HBc-only +	n anti-HBc +	%	n a-HBc-only +	n anti-HBc +	% *
<29	6	28	21,4	0	6	0	0	1	0
30-39	5	63	7,9	2	25	8,0	0	4	0,0
40-49	13	140	9,3	2	51	3,9	5	14	35,7
50-65	23	165	13,9	14	105	13,3	6	48	12,5
Ukupno	47	396	11,8	18	187	9,6	11	67	16,4

* 2017. odnosi se na HBc pozitivne/anti-HBs negativne DDK

+ = pozitivan rezultat

3.6. REZULTATI OSTALIH SEROLOŠKIH ISPITIVANJA NA HBV

BILJEGE

Rezultati ostalih seroloških ispitivanja prikazani su u *tablici 3.10.* (preuzeto iz Miletić i sur., 2019; uz suglasnost nakladnika).

Tablica 3.10. Rezultati ostalih seroloških i molekularnih ispitivanja na anti-HBc pozitivnim uzorcima krvi DDK-a

Test	Godina ispitivanja								
	2004.			2013.			2017.		
	n testiranih	n pozitivnih	%	n testiranih	n pozitivnih	%	n testiranih	n pozitivnih	%
HBsAg test rutinski i alternativni	7561	0	0	7318	0	0	5090	0	0
<i>Anti-HBc</i>	<i>7561</i>	<i>396</i>	<i>5,24</i>	<i>7318</i>	<i>187</i>	<i>2,56</i>	<i>5090</i>	<i>67</i>	<i>1,32</i>
Anti-HBc IgM	396	1(gz ^a)	0,25	187	0	0	67	0	0
Anti-HBs	396	319	80,56	185	162	87,57	67	55	82,09
Anti-HBe	396	147	37,12	187	62	33,16	0	nt ^b	-
HBeAg	396	0	0	187	0	0	0	nt ^b	-
HBV DNA	47	0	0	7318	0	0	5090	0	0

^a = grey-zona (siva zona testa)

^b = nije testirano

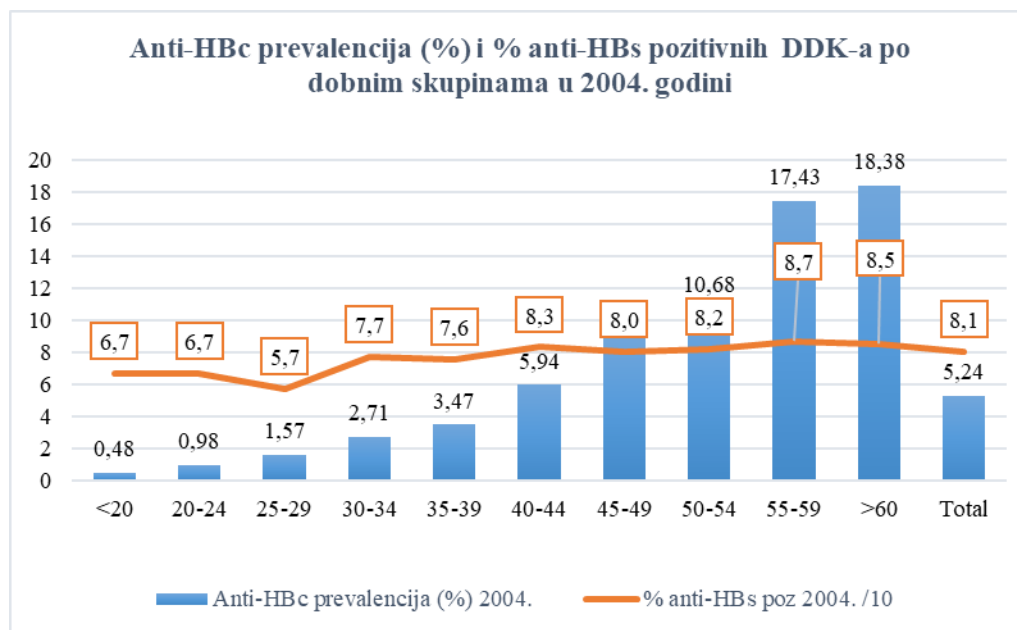
3.6.1. HBsAg

HBsAg nije dokazan u ispitivanim skupinama anti-HBc pozitivnih DDK-a s dva različita HBsAg testa.

3.6.2. Anti-HBs

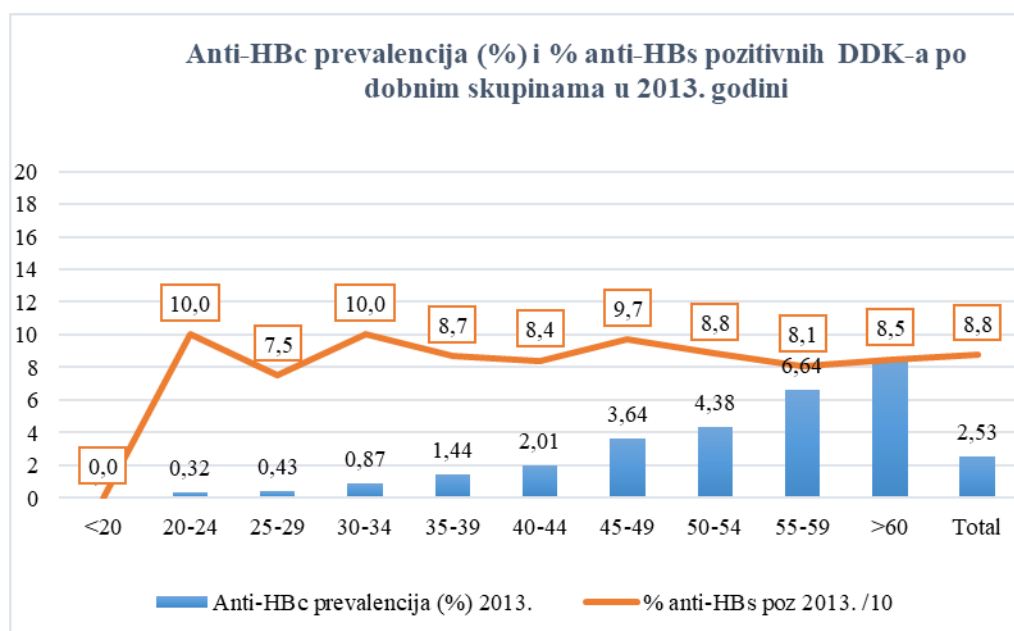
Rezultati ispitivanja pokazali su gotovo jednake udjele anti-HBs-a (80,56 % i 87,57 %), *slika 3.23.*, *3.24.* i *3.25.*, i anti-HBe-a (37,12 % i 33,16 %) pozitivnih u anti-HBc pozitivnih

DDK-a u 2004. i 2013. godini ($P=0,077$) / ($P=0.587$). Bez statističke značajnosti je i udio pozitivnih anti-HBs u anti-HBc pozitivnih DDK-a 2013. (87,57 %) i 2017. godine (82,09 %), ($\chi^2=1.03$; $P=0.310$).



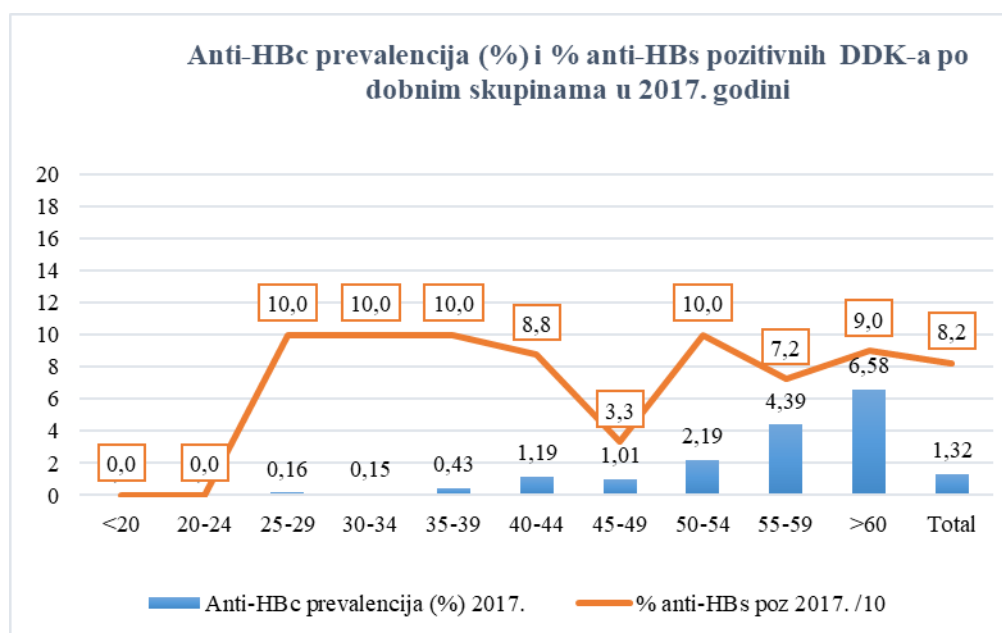
Slika 3.23. Odnos prevalencije anti-HBc pozitivnih DDK-a i njihovih anti-HBs pozitivnih rezultata u 2004. godini

Apscisa predstavlja dobne skupine DDK-a iz 2004. godine, a ordinata udio (postotak - %) anti-HBc i anti-HBs pozitivnih DDK-a. Plave kolone su anti-HBc prevalencije, a žuta crta udio anti-HBs pozitivnih u anti-HBc pozitivnih DDK-a.



Slika 3.24. Odnos prevalencije anti-HBc pozitivnih DDK-a i njihovih anti-HBs pozitivnih rezultata u 2013. godini

Apscisa predstavlja dobne skupine DDK-a iz 2013. godine, a ordinata udio (postotak - %) anti-HBc i anti-HBs pozitivnih DDK-a. Plave kolone su anti-HBc prevalencije, a žuta crta udio anti-HBs pozitivnih u anti-HBc pozitivnih DDK-a.



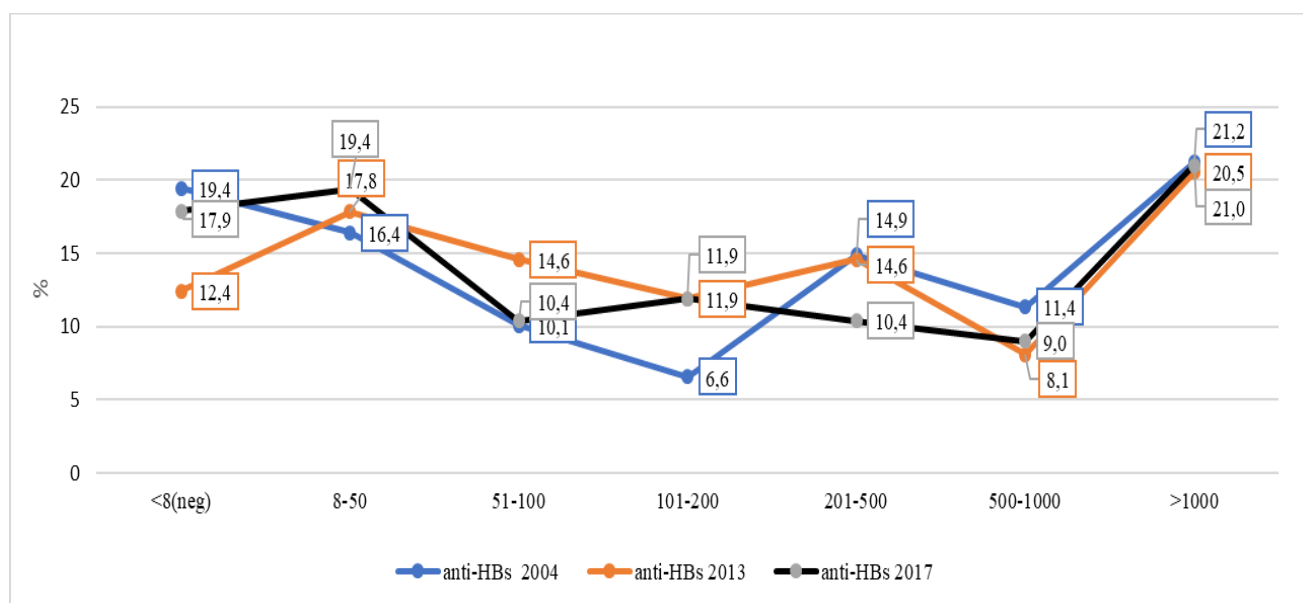
Slika 3.25. Odnos prevalencije pozitivnih DDK-a i njihovih anti-HBs pozitivnih rezultata u 2017. godini

Apscisa predstavlja dobne skupine DDK-a iz 2017. godine, a ordinata udio (postotak - %) anti-HBc i anti-HBs pozitivnih DDK-a. Plave kolone su anti-HBc prevalencije, a žuta crta udio anti-HBs pozitivnih u anti-HBc pozitivnih DDK-a.

Razdioba titra anti-HBs-a prikazana je u *tablici 3.11.* i *slici 3.26.* Titar anti-HBs-a > 100 IU/L imalo je 54,1 %, 55,1 % i 52,3 % DDK-a u tri ispitne godine, što je statistički značajna razlika 2013. u odnosu na 2017. godinu ($P=0,002$) i ukupno gledajući, 2004. u odnosu na 2017. godinu ($P=0,04$). Statistički značajna razlika s $P<0,0001$, bila je kod DDK-a s titrom anti-HBs > 200 IU/L, s udjelima od 47,5 %, 43,2 % i 40,4 %, u sve tri ispitne godine.

Tablica 3.11. Razdioba titra anti-HBs-a u anti-HBc pozitivnih DDK-a

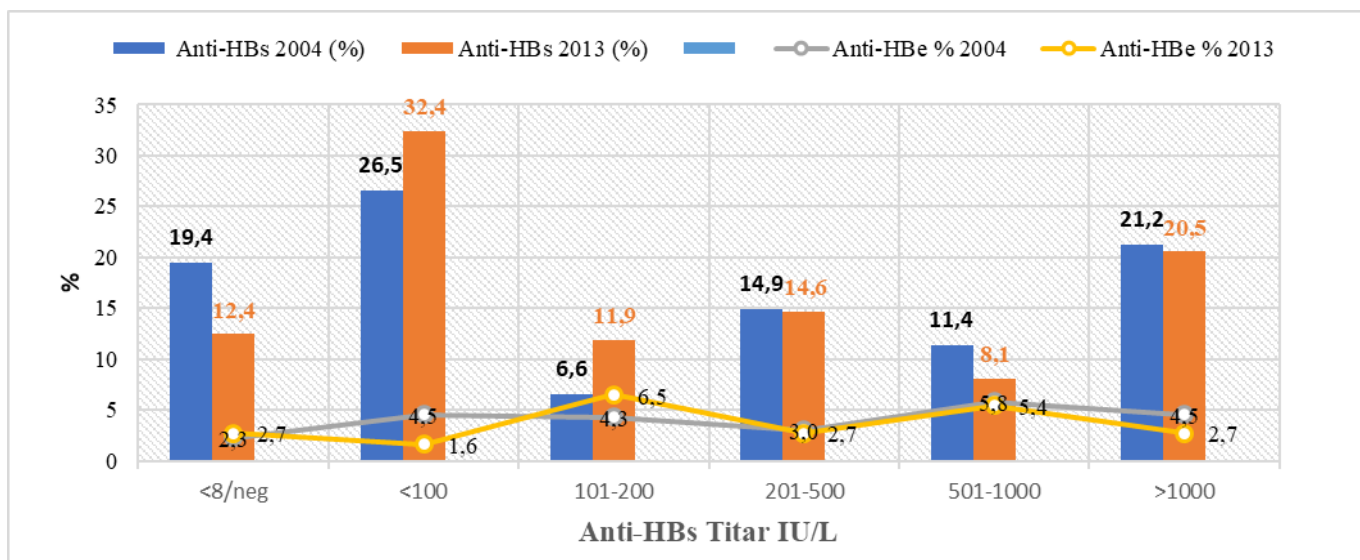
Anti-HBs IU/L	Godina ispitivanja		
	2004. % DDK	2013. % DDK	2017. % DDK
<8(neg)	19,4	12,4	17,9
8-50	16,4	17,8	19,4
51-100	10,1	14,6	10,4
101-200	6,6	11,9	11,9
201-500	14,9	14,6	10,4
500-1000	11,4	8,1	9,1
>1000	21,2	20,5	20,9

**Slika 3.26. Razdioba titra anti-HBs-a (IU/L) u anti-HBc pozitivnih DDK-a**

Apscisa predstavlja titar anti-HBs-a (IU/L), a ordinata udio (postotak - %) anti-HBc i anti-HBs pozitivnih DDK-a. Plava crta predstavlja izračunate udjele za 2004., narančasta za 2013. i crna za 2017. godinu.

3.6.3. Anti-HBe

Bez statistički značajne razlike ($\chi^2 = 0,37$; $P = 0,540$) distribuiran je anti-HBe prema titru anti-HBs 2004. i 2013. godine u anti-HBc pozitivnih DDK-a, a kako je prikazano na slici 3.27.



Slika 3.27. Razdioba prisutnosti anti-HBe-a prema titru anti-HBs-a u anti-HBc pozitivnih DDK-a u 2004. i 2013. godini

Apscisa predstavlja titar anti-HBs-a (IU/L), a ordinata udio (postotak - %) anti-HBc, anti-HBs i anti-HBe pozitivnih DDK-a. Plave kolone predstavljaju udio anti-HBs pozitivnih DDK-a iz 2004., a narančaste kolone iz 2013. godine. Siva crta predstavlja udio anti-HBe pozitivnih DDK-a iz 2004., a žuta iz 2013. godine.

3.6.4. Anti-HBc IgM

Svi anti-HBc pozitivni DDK-i bili su anti-HBc IgM negativni.

3.7. REZULTATI MOLEKULARNIH ISPITIVANJA

Na HBV DNA ispitano je 2004. godine samo 47 uzoraka krvi DDK-a jer je to ispitivanje imalo fokus na procjenu učestalosti anti-HBc-*only* pozitivnih davatelja i njihovu infektivnost, i svi ispitani DDK-a bili su negativni. Uzorci DDK-a testiranih na anti-HBc 2013. (7318) i 2017. (5090) godine rutinski su ispitani visoko osjetljivim ID-NAT testovima na HBV DNA i imali su negativan nalaz.

3.8. REZULTATI ODREĐIVANJA AVIDNOSTI ANTI-HBc IgG-a

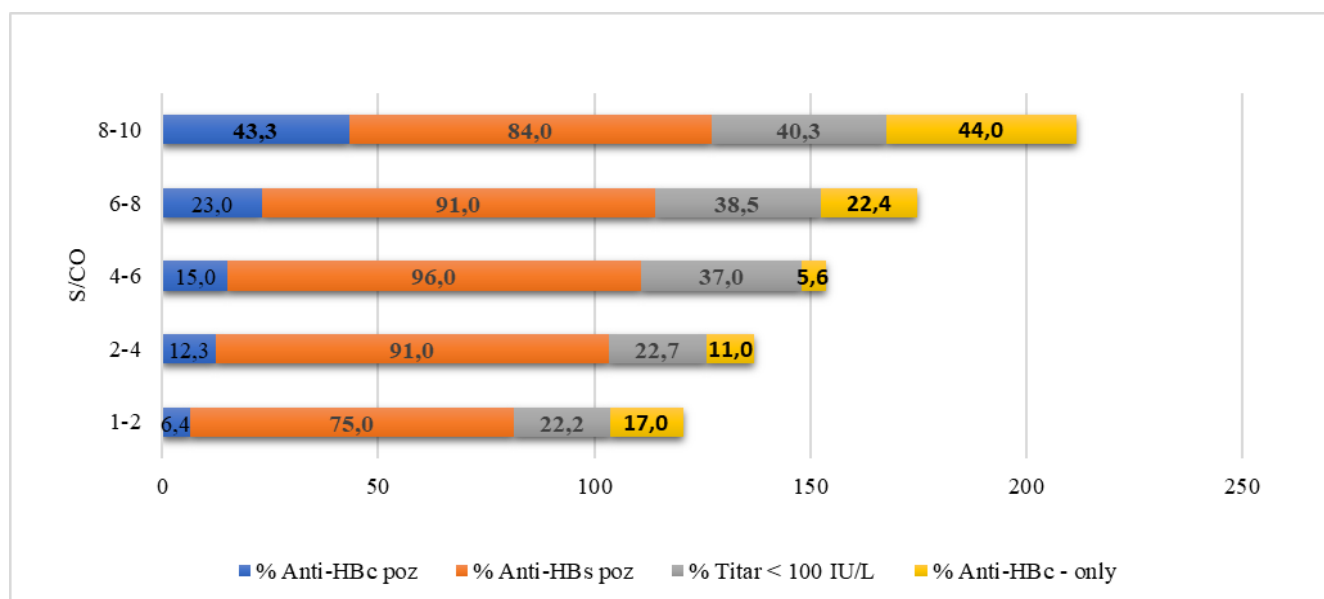
Avidnost IgG klase anti-HBc-a određena je u 99 uzoraka anti-HBc pozitivnih DDK-a iz 2013. godine. Srednja vrijednost indeksa avidnosti je 0,92 (95 %CI 0,89 – 0,94) , median 0,91. Iznimak je bio jedan uzorak koji je imao indeks avidnosti 0,57.

3.9. ANALIZA RAZINE RAKTIVNOSTI (S/CO) U ARCHITECT ANTI-HBc II TESTU

Analizirana je razina anti-HBc reaktivnosti (S/CO) u anti-HBc Architect testu (Architect Anti-HBc II) u 2013. godini, kako bi se utvrdila korelacija reaktivnosti anti-HBc-a u anti-HBc pozitivnih DDK-a s učestalošću anti-HBc-*only*, anti-HBs pozitivnih, razinom titra anti-HBs-a i anti-HBe reaktivnosti, *slika 3.28*.

Analiza je pokazala da 43,3 % anti-HBc pozitivnih DDK-a imalo visoku razinu reaktivnosti u navedenom testu (S/CO 8-10). U toj je skupini bilo najviše anti-HBc-*only* pozitivnih DDK-a, 44 %. Dokazana je povezanost razine S/CO reaktivnosti anti-HBc-a i učestalosti anti-HBc-*only* ($\rho=1$; $P<0,001$), za razliku od slabe povezanosti razine S/CO reaktivnosti anti-HBc-a i učestalosti anti-HBs-a, ($\rho= 0,21$; $P=0,741$). Postoji povezanost između razine S/CO reaktivnosti anti-HBc-a i titra anti-HBs-a, $P<0,001$, dok povezanost

između razine S/CO reaktivnosti anti-HBc-a s učestalosti anti-HBe nije dokazana ($\rho=0,6$; $P=0,285$).



Slika 3.28. Odnos razine S/CO reaktivnosti anti-HBc testa 2013. godine i učestalosti (%) anti-HBc-only, anti-HBs i titra anti-HBs-a i anti-HBe pozitivnih DDK-a

Apscisa predstavlja postotak (%) anti-HBc pozitivnih DDK-a (plave kolone), anti-HBs pozitivnih DDK-a (narančaste kolone), DDK-a s titrom anti-HBs-a nižim od 100 IU/L (sive kolone) te anti-HBc-only pozitivne DDK-a iz 2013. godine, a ordinata dobivenu vrijednost S/CO.

3.10. PREVALENCIJA OBI-ja U POPULACIJI DDK-a

Obveznim testiranjem prikupljenih doza krvi od DDK-a, u Republici Hrvatskoj u 2013. i 2017. godini, HBsAg i ID-NAT tripleks testovima, prevalencija OBI-ja u Republici Hrvatskoj i HZTM-u te prevalencija anti-HBc pozitivnih DDK-a u HZTM-u prikazana je u *tablici 3.12.*

Tablica 3.12. Prevalencija OBI-ja i anti-HBc-a u populaciji DDK-a

Godina	n DDK-a s OBI-jem (RH)	Prevalencija DDK-a s OBI-jem u RH	n pozitivnih-anti-HBc DDK s OBI-jem	Prevalencija DDK-a s OBI-jem u HZTM-u	Prevalencija anti-HBc pozitivnih DDK-a HZTM-a
2013.	21	1:7031	21	1:11.213	1:19 (396/7561)
2014.	17	1:10.788	16	1:9824	
2015.	9	1:21.726	9	1:26.511	
2016.	2	1:98.494	2	1:52.960	
2017.	7	1:28.495	7	1:30.932	1:76 (67/5090)
2018.	1	1:195.815	1	0	

3.11. OSTATNI RIZIK

Za ostatni rizik, RR, korišteni su slijedeći podaci prikazani u *tablici 3.13.*

Tablica 3.13. Parametri za izračun RR-a

Parametri za izračun RR-a za HBV za donacije HZTM-a			
Kalendarska godina	2004.	2013.	2017.
Ukupno VD	31753	42827	43713
Ukupno ND	7528	6176	6747
Ukupno doza krvi/godini	71.897	100.920	105.323
n HBV potvrđeno pozitivnih VD	4	12	4
WP izražen u godinama	0,15	0,096	0,041
Incidencija HBV /100.000 VD	126	280	92
Korigirana incidencija /100.000 VD	365	813	265
RR_{VD}/10⁶	55	78	11
Prevalencija HBV /100.000 ND	1096	2438	796
RR_{ND}/10⁶	164	234	33
Udio doza VD %	0,89	0,94	0,94
Udio doza ND %	0,11	0,06	0,05

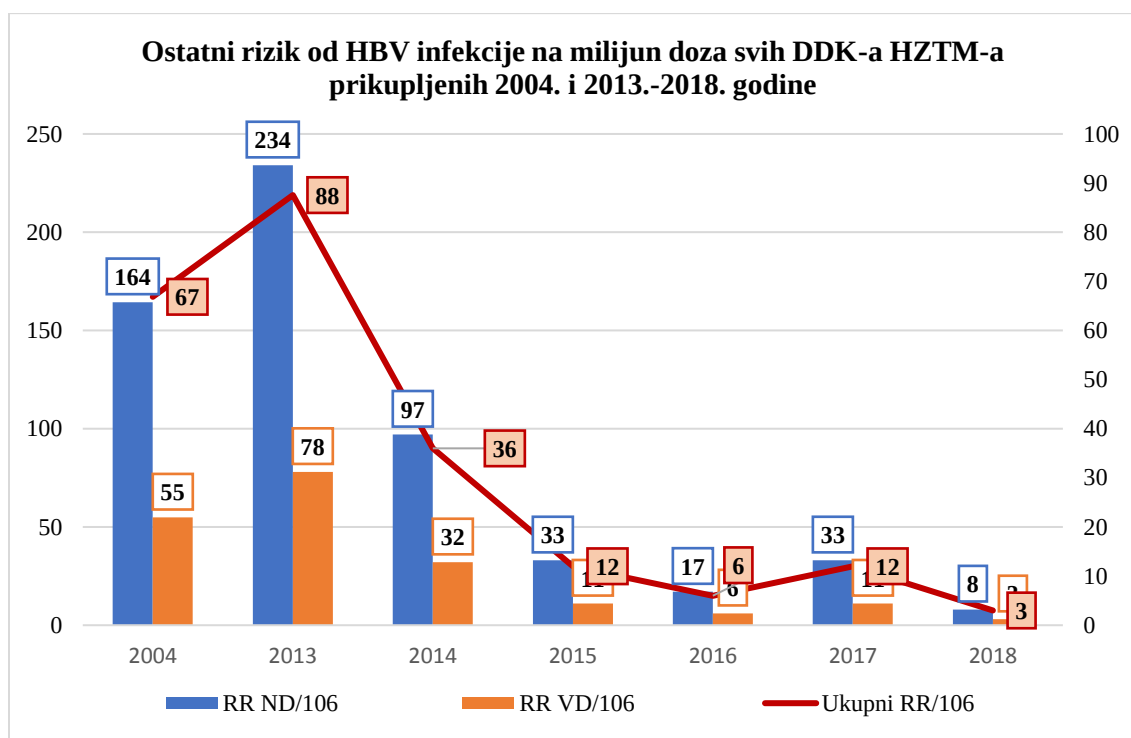
ND= novi DDK; VD= višestruki DDK; WP=window period; RR=ostatni rizik

Ostatni rizik od prijenosa HBV infekcije dozama krvi DDK-a HZTM-a, bez i s korekcijom za OBI, WP i eventualne greške u testiranju, prikazan u novih DDK-a i višestrukih DDK-a te ukupni RR prikazan je u *tablici 3.14.* i na *slici 3.29.*

Tablica 3.14. Ostatni rizik od prijenosa HBV infekcije dozama krvi DDK-a HZTM-a bez i s korekcijom za OBI, WP i eventualne greške

RR	2004.	2013.	2014.	2015.	2016.	2017.	2018.
RR/10⁶ donacija VD	19	27	11	4	2	4	1
Korigirani RR/10⁶ donacija VD	55	78	32	11	6	11	3
RR/10⁶ donacija ND	57	81	34	11	6	11	3
Korigirani RR/10⁶ donacija ND	164	234	97	33	17	33	8
Ukupni RR/10⁶	67	88	36	12	6	12	3

ND= novi DDK; VD= višestruki DDK; RR=ostatni rizik



Slika 3.29. Ostatni rizik od HBV infekcije u HZTM-u

Apscisa predstavlja godine testiranja DDK-a, a apscisa ostatni rizik (RR) od prijenosa HBV-a od DDK-a HZTM-a. Plave kolone predstavljaju RR za nove DDK-a (ND), a narančaste za višestruke DDK-a (VD). Crvena crta je ukupni RR.

4. RASPRAVA

Hepatitis B prenosi se krvlju davatelja koji su u obveznim testovima na HBV pokazali lažno negativan rezultat. Utvrđeno je da se prije 1970. godine stopa prijenosa HBV-a transfuzijama bila oko 6 % u višestruko-transfundiranih pacijenta. Zadnjih nekoliko desetljeća sigurnost je transfuzijskog liječenja u odnosu na HBV iznimno povećana kontinuiranim razvojem osjetljivih i specifičnih seroloških testova za detekciju HBsAg-a i anti-HBc-a. Svi HBV testovi danas u primjeni imaju WP koji varira od 15-50 dana, što znači da nema apsolutno osjetljivog testa kojim bi se detektirala HBV infekcija kako *in statu nascendi* tako i dalje u prirodnom tijeku infekcije. Globalno uvođenje NAT testiranja u razdoblju od 2004. do 2008. godine dodatno je smanjilo ostatni rizik od prijenosa HBV-a transfuzijama krvnih pripravaka smanjujući pre-serokonverzijski WP i detekcijom OBI infekcija (Roth i sur., 2012). Unatoč tomu, ostatni rizik od prijenosa HBV-a je i dalje najviši od ostalih virusnih infekcija, a odnosi se na donacije krvi koje su HBsAg negativne s kontinuirano niskom koncentracijom virusne DNA koju ne mogu detektirati niti trenutno najosjetljiviji NAT testovi. Kombinacijom različitih testova moguće je povećati ukupnu učinkovitost testova u otkrivanju DDK-a zaraženih HBV-om.

Oko 23 % zemalja članica WHO usvojile su univerzalno testiranje krvi za transfuzijsko liječenje molekularnim HBV DNA (NAT) testom u kombinaciji s HBsAg-om i anti-HBc-om. U nekim zemljama, najviše u Europi, primjenjuju se i drugi modaliteti testiranja pa se na anti-HBc testiraju samo novi ili uz njih i višestruki davatelji krvi s dužim interdonacijskim razdobljima (EDQM, 2015).

Za smanjenje rizika od prijenosa HBV-a transfuzijama krvnih pripravaka, krv dobrovoljnih davatelja trebala bi se ispitivati na prisutnost anti-HBc-a u zemljama s prevalencijom anti-HBc-a nižom od 2–4%. U zemljama s višom prevalencijom čini se nužnim detektirati HBV DNA u uzorcima krvi dobrovoljnih davatelja. Osim ispitivanja krvi dobrovoljnih davatelja na prisutnost anti-HBc-a i HBV DNA, za smanjenje rizika od prijenosa HBV-a krvnim pripravcima primjenjuje se i inaktivacija patogena kemijskim agensima i UV zračenjem koji sprječavaju replikaciju DNA ili RNA. Za prevenciju ostaje i mogućnost cijepljenja potencijalnih primatelja.

4.1. SMANJENE RIZIKA OD PRIJENOSA HBV-a TRANSFUZIJAMA

KRVI

4.1.1. Selekcija davatelja krvi

Davatelji krvi, dobrovoljni i neplaćeni, te pre-donacijska selekcija, koja se uglavnom sastoji od popunjavanja upitnika o cijelom nizu mogućeg izlaganju krvlju prenosivih infekcija, i povjerljiv liječnički pregled, doprinose značajno nižoj prevalenciji krvlju prenosivih infekcija u davatelja krvi. Sve te informacije iznimno ovise o edukaciji DDK-a i točnim i iskrenim odgovorima istih. Post-donacijske informacije pokazuju da 22-28 % inficiranih DDK-a ipak prizna rizične ekspozicije što rezultira trajnim odbijanje za davanja krvi. Isti autori pokazali su da 10 % DDK-a inficiranih HBV-om koji nisu priznali rizične odnose spadaju u skupinu MSM-a, dok je glavni infektivni rizik u svih HBV pozitivnih DDK-a bio ili HBV iz zemlje porijekla ili povezanost sa zemljom endemskom za HBV (Polizzotto i sur., 2008; Slot i sur., 2016).

4.1.2. HBsAg test i HBV prevalencija

HBsAg testovi koji se danas koriste u testiranju krvi DDK-a automatizirani su i visoko osjetljivi (EIA: limit detekcije 0,013 – 1 IU/mL; CMIA: limit detekcije: 5 mIU/mL; ICT-CLIA: limit detekcije: 0,5 mIU/mL). Prema *Taormina Consensus Conference* (Raimondo i sur., 2008), OBI se definira kao prisutnost virusne DNA bez prisustva površinskoga antigena (HBsAg) u krvi izvan WP-a infekcije. Međutim, 2019. godine dorađena je definicija OBI-ja, upravo zbog pojave iznimno visoko osjetljivih HBsAg testova: OBI je prisustvo replikacijski kompetentne HBV DNA u jetri i/ili HBV DNA u krvi, a HBsAg je negativan s trenutno dostupnim HBsAg testovima, s/ili bez anti-HBc-a ili anti-HBs-a (Raimondo i sur., 2019).

HBV prevalencija, izražena na 100.000 doza krvi dobrovoljnih davatelja prikupljenih u Republici Hrvatskoj od 1998. do 2018. godine prikazana na *slici 1.5.* ovog istraživanja (od 1998. do 2012. godine izračunata na potvrđeno pozitivnim HBsAg rezultatima, a od 2013. do 2018. godine na potvrđeno pozitivnim HBsAg i/ili HBV-ID-NAT rezultatima), ima negativan

trend. 1998. godine prevalencija je bila 90,7, a 2018. godine 3,6. Prevalencija HBV-a je i u općoj populaciji ima trend pada pa je Republika Hrvatska zemlja niske HBV endemičnosti.

Kako bi se isključile moguće 's' mutacije, svi anti-HBc pozitivni DDK-i u ovom istraživanju ispitani su i s alternativnim HBsAg testom. Svi rezultati ispitivanja uzoraka donacija krvi DDK-a, a ispitano je 19.969 uzoraka, bili su negativni na HBsAg.

4.1.3. Anti-HBc test

4.1.3.1. Anti-HBc prevalencija

Sumnja na prijenos HBV-a krvlju anti-HBc pozitivnih davatelja krvi, postavljena je kasnih 1970.-tih, ali je potisnuta i nakratko zanemarena pred izazovima novo otkrivenih krvlju prenosivih virusa (HIV i HCV) (Katchaki i sur., 1980).

U nedostatku HIV specifičnog testa, anti-HBc je u SAD-u korišten kao biljeg rizičnog spolnog ponašanja, s visokom učinkovitošću kod etabliranih HIV infekcija, a slabijom kod HIV infekcije u WP-u (Simon i Bankhurst, 1984; Korelitz i sur., 1996; Bush i sur., 1997). Obveznim testom, kao surogatni test za tzv. non-A, non-B hepatitis (NANBH), kasnije virusni hepatitis C (HCV), uveden je u SAD-u i drugim visokorazvijenim zemljama. Njegovom primjenom došlo je do redukcije ne samo postransfuzijskog hepatitisa C, nego i postransfuzijskog hepatitisa B, zbog čega se u SAD-u nakon uvođenja anti-HCV, nastavilo s njegovim korištenjem u ispitivanju krvi za transfuzijsko liječenje. Procjenjuje se da je uvođenjem na ovaj način u SAD-u reducirano postransfuzijski hepatitis B za 33-50 % (Blajchman i sur., 1995; Chambers i Popovsky, 1991; Allain i sur., 1999).

Prevalencija anti-HBc-a u dobrovoljnih davatelja je u: SAD-u 0,23 %, Ujedinjenom Kraljevstvu 0,56 %, Danskoj 0,70 %, Japanu 1,1 %, Njemačkoj 1,88 %, Italiji 4,85 %, Indiji 10,82 %, Južnoj Koreji 13,5 %, Egiptu 14,2 %, Grčkoj 14,9 % , u Pakistanu 17,28 % (Seo i sur., 2015), u Nizozemskoj je to 0,76 % (Van der Larr i sur., 2015), a u Turskoj 10 % (Yilmaz i sur., 2016). Očekivano visoka prevalencija anti-HBc pozitivnih DDK-a je u Kini, 47,4 %, i varira od 32,6 % u DDK-a mlađih od 30 godina do 69,8 % u mlađih od 50 godina (Ye i sur., 2017).

Obzirom da anti-HBc testovi pokazuju različite specifičnosti, unatoč poboljšanjima, i nedostatak potvrdnog testiranja, neophodno je rezultate testirati u alternativnom anti-HBc testu kako bi se razlučili stvarno pozitivni od lažno pozitivnih rezultata. U istraživanju opisanom u ovom radu, korištena su dva alternativna anti-HBc testa, te se pozitivnim rezultatom smatrao onaj koji je pozitivan u dva od tri anti-HBc testa. Rezultati istraživanja pokazuju da je u razdoblju od 14 godina došlo do značajnog pada prevalencije anti-HBc-a s 5,24% na 1,32% u populaciji DDK-a HZTM-a, što je uglavnom posljedica pada prevalencije u višestrukih davatelja krvi s 5,90 % na 1,38 %. Pad anti-HBc prevalencije 2013. u odnosu na 2004. godinu bio je neovisan o spolu (indeks pada ženski višestruki DDK/ indeks pada muški višestruki DDK= 2,06/2,08), dok je 2017. u odnosu na 2013. godinu pad prevalencije u muških višestrukih DDK-a bio veći (indeks pada muški višestruki DDK/indeks pada ženskih višestrukih DDK=1,99/1,49). Najveći pad prevalencije a-HBc-a zabilježen je kod muških višestrukih DDK-a u dobi 25-40 godina (10 – 18 puta), a kod žena u dobi 40-49 godina. Uspoređujući prevalencije anti-HBc-a u drugim zemljama, Republika Hrvatska spada u zemlje niske prevalencije anti-HBc-a u populaciji DDK-a, a prema rezultatima iz 2017. godine.

Pad prevalencije anti-HBc-a u novih davatelja krvi s 1,37 % u 2004. na 0,88 % u 2013. godini nije bio značajan, kao i 2017. u odnosu na 2013. godinu s 0,88 % na 0,32 %. 2004. godine među DDK-ima osim sporadično, nije bilo cijepljenih protiv HBV-a, dok je 2013. godine udio cijepljenih, a to su davatelji u dobi do 24 godine, među testiranima bio 10,4 %, a 2017. bilo je 27,3 % (dob do 29 godina). U dobnoj skupini do 24 godine, prevalencija anti-HBc-a 2013. je bila 0,32 % (novi 0 %, a višestruki 0,37%), a 2017. godine 0 % (novi 0% i višestruki 0%). Budući razlika u prevalenciji anti-HBc-a 2004./2013. i 2013./2017. godine među novim davateljima nije statistički značajna treba zaključiti da je izloženost HBV-u u toj dobi kontinuirano niska. Novih davatelja u Republici Hrvatskoj razmjerno je malo i sve manje, oko 6 % i regrutiraju se iz mlađih dobnih skupina (Stojić Vidović i sur., 2014). Tako je 2017. godine među anti-HBc ispitanih novih davatelja njih 81 % bilo mlađe od 29 godina, što bi značilo da su bili obuhvaćeni obveznim cijepljenjem protiv hepatitisa B.

Mogući čimbenici odgovorni za pad prevalencije anti-HBc-a su, osim dobnog pomaka populacije višestrukih davatelja, pad prevalencije u općoj populaciji temeljen na funkcioniranju preventivnih mjera poput obveznog testiranja trudnica, univerzalnog cijepljenja, razina sigurnosti u zdravstvenim i paramedicinskim ustanovama, osjetljivog postupka selekcije davatelja i uniformnosti postupaka testiranja davatelja krvi, organa, tkiva i stanica,

centraliziranog postupka potvrde reaktivnosti HBV biljega, jedinstvene baze davatelja krvi i informatičkog sustava. Važan specifični čimbenik za pad prevalencije anti-HBc-a je implementacija ID-NAT testiranja 2013. godine. Stoga, kada bi korigirali prevalenciju anti-HBc pozitivnih DDK-a iz 2017. godine za broj DDK-a HZTM-a s OBI-jem (ukupan broj= 27, od 2013. do 2017. godine), anti-HBc prevalencija bila bi 1,85 %. Potrebno je napomenuti da cijepljenje protiv HBV-a može dovesti do pojave *escape* mutanata, a kako razina neutralizirajućih anti-HBs vremenom pada, ljudi mogu biti osjetljivi na HBV infekciju i to onim genotipom HBV-a koji nije korišten u cjepivu – A2 (Stramer i sur., 2011).

Iako je prevalencija anti-HBc-a u populaciji davatelja krvi primarni prediktor uvođenju ovog testa u postupak obveznog testiranja, *cut-off* prevalencija za njegovo uvođenje nije utvrđen. Novije se prevalencija anti-HBc-a od 2 % (ISBT TTID Working Party) spominje mogućom granicom iznad koje se mora značajno povećavati broj davatelja krvi. Visoka prevalencija anti-HBc-a ne znači uvijek i visoku učestalost OBI-ja, naime, udio HBV DNA pozitivnih među anti-HBc pozitivnim DDK varira od 0-100 % (Makroo i sur., 2012).

4.1.3.2. Anti-HBc test kao suplementni test u algoritmu potvrde NRR ID-NAT

rezultata

Obzirom da se anti-HBc test koristi u Republici Hrvatskoj i kao suplementni test u algoritmu potvrde inicijalno reaktivnih pa opetovano nereaktivnih (NRR) DDK-a u ID-NAT testu, kada HBV DNA nije moguće potvrditi diskriminacijskim ID-NAT testom i/ili kvantitativnim HBV DNA testom visoke osjetljivosti, rezultati ID-NAT testiranja uzoraka DDK-a od 2013. do 2018. godine pokazali su 637 takva uzorka krvi, od kojih je 150 bilo anti-HBc pozitivno (upućuju na prokuženost HBV-om), a 487 anti-HBc negativno što upućuje na lažno pozitivnu reaktivnost u ID-NAT testu ili eventualnu slabu osjetljivost primjenjenog anti-HBc testa.

4.1.4. Molekularni (NAT – HBV/HCV/HIV) testovi probira

Uvođenje NAT-a u ispitivanju davatelja krvi dovelo je do spoznaje učinkovitosti anti-HBc-a u otkrivanju OBI infekcije, ali kvalitativni anti-HBc test ne diskriminira zaražene od nezaraženih davatelja zbog čega je njegova uporaba u populacijama visoke prevalencije uvjetovana paralelnim testiranjem molekularnim testom, ispitivanjem titra ili drugih HBV biljega (Allain, 2004; Stramer i sur., 2012; Lelie i sur., 2017; O'Brien i sur., 2007).

Učestalost WP HBV i OBI infekcija nakon uvođenja NAT-a (rezultati NAT testiranja pozitivni, a serološki negativni) prikazao je Lelie sa suradnicima: a) za WP HBV infekcije - kod novih DDK-a: Južna Afrika 1:7700; Jugo-istočna Azija 1:23.000; Mediteran 1:29.000; kod višestrukih DDK-a: Južna Afrika 1:30.000, Jugo-istočna Azija 1:40.000, Mediteran 1:90.000, Srednja i Sjeverna Europa 1:465.000, b) za OBI infekcije – kod novih DDK-a: Južna Afrika 1:3900, Jugo-istočna Azija 1:7700, Egipat 1:10.000, Mediteran 1:12.000, Oceanija 1:31.000, Srednja i Sjeverna Europa 1:59.000. Općenito je frekvencija otkrića WP HBV-a : OBI-ja = 28 % : 72 % (Lelie i sur., 2017).

Učestalost WP HBV i OBI infekcija nakon uvođenja ID-NAT testiranja u Republici Hrvatskoj u periodu od 2013. do 2018. godine je za: a) WP infekciju 1:1.117.253, b) OBI infekcije: 1:19.262. U Francuskoj je doprinos NAT testiranja u odnosu na OBI 72 % (43/60) (Candotti i sur., 2017), a u Republici Hrvatskoj u periodu od 2013. do 2018. godine 98 % (Babić i sur., usmena komunikacija).

4.2. OBI U DOBROVOLJNIH DAVATELJA KRVI

Razlike u učestalosti OBI-ja pripisuju se genomskim i epigenomskim karakteristikama virusne DNA, i DNA hepatocita domaćina, dok za genotip ovisnu učestalost još nema dovoljno dokaza, ali dokaže li se, i to bi mogao biti važan faktor u ocjeni uporabnosti anti-HBc testa u nekom geografskom okruženju (Zhu i sur., 2016). Prevalencija OBI-ja je neovisna o HBV genotipu, a varira u odnosu na geografska područja i opću HBV epidemiologiju. Regionalna prevalencija varira od 1:3400 i 1:59.000 u novih DDK-a, do 1:6000 i 1:64.500 u višestrukih DDK-a (Lelie i sur., 2017).

Prevalencija OBI-ja u populaciji davatelja krvi u europskim zemljama varira od 0,0002 % do 0,084 % (Raimondo i sur., 2007; Dettori i sur., 2009; Velati i sur., 2008; Brojer i sur., 2006; Katsoulidou i sur., 2009; Svicher i sur., 2012), a prema Allainu i suradnicima iznosi 1:1000 do 1:50.000 donacija krvi (Allain i sur., 2013). U Kini, koja je visoko endemična HBV regija, 0,18 % (Huang i sur., 2012).

Rezultati istraživanja prikazani u ovom radu, pokazuju da je prevalencija anti-HBc-a u populaciji DDK-a HZTM-a od 1:19 u 2013. i 1:76 u 2017. godini, značajno viša od prevalencije DDK-a s OBI-jem. Iako provedena ispitivanja nisu među anti-HBc pozitivnim DDK-a dokazala prisutnu OBI infekciju (niti HBV DNA niti OBI DDK nisu detektirani među 47 anti-HBc-only pozitivnih DDK-a iz 2004. godine, testiranih Cobas TaqMan HBV test Version 2.0. Roche testom, kao niti među 12.408 DDK-a ispitanih visoko osjetljivim ID-NAT testovima), prevalencija OBI-ja među davateljima krvi u Republici Hrvatskoj u prvoj godini testiranja ID-NAT testom bila je 1:7031 (Babić i sur., 2014), a nakon trogodišnjeg razdoblja 1:10.900 donacija (Safic Stanic i sur., 2017). U 2017. godini učestalost je još manja, 1:28.495. Analizom arhivskih uzoraka za 23 OBI davatelja utvrđena je konzistentnost anti-HBc pozitivnog nalaza (100%), za razliku od ID-NAT (63 %), i reproducibilnost ID-NAT od 50 %, što je očekivano za uzorke niskog sadržaja HBV DNA (Mihaljević i sur., 2014). 56 od 57 DDK-a s OBI-jem (od 2013. do 2018 godine) bilo je anti-HBc pozitivno. Ovi podaci podupiru važnost anti-HBc testa u otkrivanju davatelja krvi s OBI-jem.

Doprinos anti-HBc testa u redukciji rizika od prijenosa HBV-a krvlju procjenjuje se najbolje kroz analizu rezultata provedenih *look-back* studija za DDK-a s OBI-jem. Stope prijenosa variraju, a ovise najviše o dostupnosti primatelja za praćenje infekcije u odgovarajućem vremenskom okviru. *Look-back* postupci provedeni za DDK-a s OBI-jem u Nizozemskoj, Japanu i Australiji pokazali su nisku stopu prijenosa od 5 %, 3,5 % i 0,2 - 3,2 % (Lieshout-Krikke i sur., 2014; Satake i sur., 2007; Seed i sur., 2015). Značajno višu stopu prijenosa (28 %) ovisnu o količini virusa (plazme) u krvnom pripravku i prisutnosti anti-HBs-a kako kod davatelja tako i primatelja krvnih pripravaka, objavili su autori multicentrične europske *look-back* studije u kojoj su korišteni i podaci za Hrvatsku (Allain i sur., 2013).

Analiza 23 OBI DDK-a, otkrivenih po uvođenju ID-NAT testiranja u Republici Hrvatskoj (Mihaljević i sur., 2014) pokazala je da je anti-HBc stabilniji biljeg OBI infekcije nego HBV DNA. Naime, ispitivanjem arhivskih uzoraka doza krvi ovih davatelja utvrđena je prisutnost anti-HBc-a u svim uzorcima, dok je HBV DNA bila dokaziva u svega 39 %. Količina

HBV DNA bila je izrazito niska, niža od 20 IU/mL. Zanimljivo je da su serološki profili HBV biljega bili u svim uzorcima ovih DDK-a isti, bez dinamike. 30 primatelja krvnih pripravaka ispitanih kroz *look-back* postupke pokazalo je da je infekcija bila prenesena na 1 imunosuprimiranog primatelja svježe smrznute plazme, a koju je isti brzo razriješio (anti-HBs, anti-HBc i anti-HBe pozitivan). U 5 primatelja (3 svježe smrznute plazme i 2 koncentrata eritrocita) dokazana su anti-HBc što bi se moglo povezati s prijenosom HBV-a od DDK-a s OBI-jem, kada se ne bi radilo o politransfundiranim pacijentima.

4.3. SEROLOŠKI PROFILI ANTI-HBc POZITIVNIH DDK-a

Rezultati istraživanja prikazanim u ovom radu, pokazuju da se serološki HBV profili anti-HBc pozitivnih DDK-a nisu značajno promijenili u ispitivanom razdoblju. Tako je udio anti-HBc-only pozitivnih DDK-a među anti-HBc pozitivnima 2004. godine bio 11,8 % i 2013. godine 9,6 %. Slična je prevalencija dobivena ispitivanjima u Engleskoj, 11,8 % (Allain, 2017) i u Italiji u novih davatelja krvi 10,4 % (Romano i sur., 2013). Razlika je međutim zabilježena u učestalosti anti-HBc-only pozitivnih DDK-a do 29 godina starosti, i to pad prevalencije (21 % 2004./0 % 2013. ($\chi^2 = 45,73$; $P < 0,05$), uglavnom kao posljedica pada prevalencije HBV-a u hrvatskoj populaciji.

Udio anti-HBs pozitivnih među anti-HBc pozitivnim DDK-ima također je bio podudaran 80,56 % u 2004., 87,57 % u 2013. i 82,1 % u 2017. godini. Titar anti-HBs-a viši od 100 IU/L imalo je 54,1 %, 55,1 % i 52,3 % DDK-a u tri ispitne godine, što je statistički značajna razlika 2013. u odnosu na 2017. godinu ($P = 0,002$) i ukupno gledajući, 2004. u odnosu na 2017. godinu ($P = 0,04$). Statistički značajna razlika s $P < 0,0001$, bila je kod DDK-a s titrom anti-HBs višim od 200 IU/L, s udjelima od 47,5 %, 43,2 % i 40,4 %, u sve tri ispitne godine. Kako bi se smanjio gubitak DDK-a zbog anti-HBc pozitivnog rezultata, uvelo se upravo dodatno anti-HBs testiranje anti-HBc pozitivnih DDK-a. Njemačka i Nizozemska koriste takve krvne donacije ukoliko je titar anti-HBs-a viši od 100 IU/L odnosno 200 IU/L (Hourfar i sur., 2009; Van de Laar i sur., 2015). Japan, kao zemlja s nešto povećanom prevalencijom HBV-a, za frakcionaciju plazme prihvaća anti-HBc pozitivne DDK-a, ali s titrom anti-HBs-a višim ili jednakim od 200 IU/L (Taira i sur., 2013). U njemačkoj studiji 51,3 % anti-HBc pozitivnih DDK imalo je titar anti-HBs-a viši ili jednak od 100 IU/L (Juhl i sur., 2016).

Anti-HBe pozitivnih 2004. godine među anti-HBc pozitivnim DDK-ima bilo je 37,12%, a 2013. godine 33,16% što upućuje na određenu stabilnost ili standardni serološki profil biljega HBsAg negativnih, a anti-HBc pozitivnih DDK-a. Anti-HBc IgM pozitivan rezultat osim u jednom slučaju 2004. godine (siva zona) nije zabilježen, kao niti HBe antigenemija.

Obzirom da su većina akutnih i kroničnih HBV infekcija asimptomatske, a desetljećima se koriste kvalitativni serološki testovi, novije HBsAg kvantitativni test, a današnji anti-HBc IgM testovi su osjetljiviji nego prijašnji testovi te mogu biti pozitivni i u kroničnoj fazi HBV infekcije (Marinos i sur., 1994), i avidnost anti-HBc IgG-a može se koristiti kao jeftin način razlučivanja akutne od kronične HBV infekcije. Povećana avidnost protutijela uočena je kod pacijenata s akutnom infekcijom ($AI = 0,65 \pm 0,19$), dok je niska avidnost bila kod pacijenata s kroničnom infekcijom ($AI = 0,91 \pm 0,14$) (Rodella i sur., 2006). Rezultati određivanja avidnosti anti-HBc IgG-a u ispitanih DDK-a iz 2013. godine, podupire procjene da je većina anti-HBc pozitivnih davatelja steklo, i u najvećem broju slučajeva razriješilo, HBV infekciju davno. Naime, prosječna avidnost (AI) anti-HBc IgG-a u 99 ispitanih uzoraka anti-HBc pozitivnih DDK-a bila je 0,92 (95 %CI 0,89 - 0,94) pa uz arbitrarni CO od 0,70 dokazuje da je prisutnost anti-HBc-a posljedica kronične, a ne akutne infekcije.

Titir anti-HBc-a nije određivan, već je analizirana reaktivnost u primjenjenom Architect Anti-HBc II testu. 43 % anti-HBc pozitivnih DDK-a imalo je visoku reaktivnost što odgovara omjeru očitane vrijednosti za uzorak (S) i CO, S/CO 8 - 10. U toj grupi je bilo i najviše anti-HBc-only DDK-a (44 %). Međutim, povezanost je slaba između razine S/CO reaktivnosti anti-HBc-a i učestalosti anti-HBs-a. Dokazana je povezanost razine S/CO reaktivnosti anti-HBc-a i učestalosti anti-HBc-only, za razliku od slabe povezanosti razine S/CO reaktivnosti anti-HBc-a i učestalosti anti-HBs-a. Postoji povezanost između razine S/CO reaktivnosti anti-HBc-a i titra anti-HBs-a, dok povezanost između razine S/CO reaktivnosti anti-HBc-a s učestalosti anti-HBe nije dokazana.

4.4. OSTATNI RIZIK OD PRIJENOSA HBV-a TRANSFUZIJAMA KRVÍ

Prijenos HBV-a na primatelje krvi od DDK-a s OBI-jem ispitao je Satake sa suradnicima (Satake i sur., 2007). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da se takav prijenos događa u oko 3

% slučajeva. Oni su također pokazali da se u 50 % prijenosa HBV-a na primatelje krvnih pripravaka događa u slučajevima prisutne virusne infekcije u WP-u. Infektivnost krvi u WP-u infekcije 10 puta je viša nego u OBI-ju s niskim titrom anti-HBc-a. Allain i suradnici utvrdili su da postotak prijenosa HBV-a od dobrovoljnih davatelja s OBI-jem iznosi 28 %. U toj studiji svi dobrovoljni davatelji imali su anti-HBc i detektabilnu količinu HBV DNA, a 38 % njih imalo je i anti-HBs u titru od 20 do 160 IU/L. Postotak prijenosa HBV-a s anti-HBs negativnim krvnim pripravcima od dobrovoljnih davatelja s OBI-jem ovisi i o vrsti krvnih pripravaka, najniži je kod transfuzije eritrocita, viši kod transfuzije trombocita, a najviši kod transfuzije svježe plazme. Prisutnost anti-HBs-a kod dobrovoljnih davatelja s OBI-jem smanjuje rizik od prijenosa infekcije za oko 5 puta. 66,7 % imunokompetentnih primatelja bilo je anti-HBc pozitivno, a svega 33 % imunokompromitiranih nakon transfuzije. Prema tome, prijenos HBV-a od dobrovoljnih davatelja s OBI-jem većinom je asimptomatska i samorješiva infekcija s postupnim razvojem anti-HBc-a i anti-HBs-a. Međutim, u imunokompromitiranih primatelja može biti fatalna (Allain i sur., 2013). Ostatni rizik od prijenosa HBV-a od DDK s OBI-jem u Australiji je 3,98 na milijun donacija krvi (Seed i sur., 2017).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je najveći izračunati ostatni rizik za prijenos HBV infekcije zaostalim zaraženim donacijama krvi DDK-a u Republici Hrvatskoj, unatoč svim negativnim rezultatima obveznog testiranja (HBsAg negativan, i NAT negativan rezultat - unatoč visokoj osjetljivosti ne detektira virusnu DNA), prema matematičkom modelu iz preporuka Europske medicinske agencije iz 2016. godine, bio 2013. godine i to 88 doza na milijun doza, kada je uveden ID-NAT test u testiranju krvi DDK-a. 2017. godine ostatni rizik iznosio je 12, a 2018. godine 3 doze na milijun doza krvi DDK-a. Ostatni rizik ima silazni trend.

4.5. SIMULACIJA UVOĐENJA ANTI-HBc TESTA KAO OBVEZNOG TESTA U TESTIRANJE KRVI DOBROVOLJNIH DAVATELJA U REPUBLICI HRVATSKOJ

Koji će se testovi koristiti u ispitivanju davatelja krvi na HBV zavisi o prevalenciji ove infekcije u općoj i populaciji davatelja krvi, morbiditetu vezanom uz transfuziju krvnih pripravaka, omjeru novih i višestrukih davatelja, samodostatnosti u opskrbi krvlju i ekonomskim mogućnostima zemlje. Odbacivanje anti-HBc pozitivnih (HBsAg negativnih), a HBV DNA negativnih krvnih doza, utjecalo bi na opskrbu krvnim pripravcima u Republici Hrvatskoj. Njemačka i Nizozemska koriste takve krvne doze ukoliko je titar anti-HBs-a viši od 100 IU/L odnosno 200 IU/L (Hourfar i sur., 2009; Van de Laar i sur., 2015).

Simulacija uvođenja anti-HBc testa u ispitivanje davatelja krvi u Republici Hrvatskoj temeljena na anti-HBc prevalenciji DDK-a HZTM-a u 2017. godini (1.32 %, 95 %CI 1.04 – 1.67 %) te na bazi 95.000 davatelja krvi godišnje (18.000 novih i 77.000 višestrukih), i prosječnom broju davanju višestrukih davatelja godišnje od 2,1, dovela bi do gubitka:

- a) 988-1586 DDK-a u slučaju univerzalnog testiranja uz eliminaciju svih anti-HBc pozitivnih što bi odgovaralo gubitku od 1869-2999 doza krvi godišnje,
- b) 472-758 DDK-a u slučaju univerzalnog testiranja uz eliminaciju anti-HBs pozitivnih s titrom manjim od 100 IU/L što bi odgovaralo gubitku 893-1434 doza krvi godišnje,
- c) 589-947 DDK-a u slučaju univerzalnog testiranja uz eliminaciju anti-HBs pozitivnih s titrom manjim od 200 IU/L što bi odgovaralo gubitku 1115-1790 doza krvi godišnje,
- d) 11-326 DDK-a u slučaju testiranja samo novih davatelja krvi.

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju važnost anti-HBc testa u otkrivanju DDK-a s mogućim OBI-jem, u slučajevima intermitentne HBV DNA viremije, te u odlučivanju odabira strategije ispitivanja DDK-a na anti-HBc, uz postojeći panel HBsAg i ID-NAT u Republici Hrvatskoj, što bi bila dodatna mjera u sprječavanju prijenosa HBV-a krvlju i krvnim pripravcima. Donošenje odluke treba poduprijeti *cost-benefit* analizama.

5. ZAKLJUČCI

Okultna infekcija virusom hepatitisa B (OBI) u davatelja krvi najčešći je uzrok prijenosa virusa hepatitisa B transfuzijama krvnih pripravaka. Obzirom da je za OBI karakterističan negativan nalaz HBsAg-a i nizak sadržaj HBV DNA, prisutna anti-HBc jedini su biljeg koji može upućivati na OBI. Kako testiranje DDK-a u Republici Hrvatskoj ne uključuje testiranje na anti-HBc, glavni cilj i svrha ovog istraživanja bio je odrediti prevalenciju anti-HBc-a u populaciji DDK-a HZTM-a, utvrditi važnost određivanja anti-HBc-a u detekciji OBI-ja, prevalenciju OBI-ja u populaciji DDK-a i procijeniti rizik od prijenosa HBV-a transfuzijama krvi uključujući i DDK-e s OBI-jem.

Na temelju provedenih istraživanja, dobivenih rezultata i rasprave može se zaključiti slijedeće:

- U vremenskom razdoblju od 14 godina, od 2004. do 2017. godine, došlo je do značajnog pada prevalencije anti-HBc-a u populaciji DDK-a HZTM-a, i to 4 puta, s 5,24 % na 1,32 %, što je uglavnom posljedica pada prevalencije u višestrukih davatelja krvi s 5,90 % na 1,38 %. 2017. godine statistički značajan pad prevalencije zabilježen je u svim dobnim skupinama DDK-a starijim od 20 godina. Najveći indeks pada prevalencije zabilježen je u dobnim skupinama od 25 do 40 godina starosti (10-18 puta). U novih DDK-a nema značajne razlike u ispitivanom razdoblju;
- Kod žena, koje inače čine svega oko 20 % populacije DDK-a u HZTM-u, kojih je u ovom ispitivanju sudjelovalo od 13,1 % do 17,4 %, značajan pad 2017. godine zabilježen je u dobnim skupinama od 25 do 34, od 40 do 44 i od 50 do 59 godina;
- Kod muških DDK-a, 2017. godine statistički značajan pad prevalencije u odnosu na 2013. godinu zabilježen je u svim dobnim skupinama starijim od 20 godina;
- Prevalencija anti-HBc-*only* pozitivnih davatelja, odnosno DDK-a kojima je od HBV biljega utvrđena prisutnost samo anti-HBc-a, značajan pad zabilježen je 2013. u odnosu na 2004. godinu, 0,62 % na 0,25 %. Udio anti-HBc-*only* među anti-HBc pozitivnima od 11,8 % 2004. i 9,6 % 2013. godine ne razlikuje se značajno. Anti-HBc-*only* pozitivnih davatelja u 2004. godini bilo je i u davatelja mlađih od 29 godina, a 2013. i 2017. ovaj tip reaktivnosti nisu pokazivali davatelji mlađi od 35 godina, uglavnom kao posljedica pada prevalencije HBV-a u našoj populaciji;
- Serološki HBV profili anti-HBc pozitivnih DDK-a nisu se značajno promijenili u ispitivanom razdoblju: udjeli anti-HBs-a i anti-HBe pozitivnih DDK-a bili su podjednaki u sve tri ispitne godine. Nije bilo HBeAg niti anti-HBc IgM pozitivnih

DDK-a. Srednja vrijednost određene avidnosti anti-HBc IgG-a je 0,92. Svi ovi rezultati upućuju na davni kontakt s HBV-om i uglavnom razriješenu infekciju;

- Prevalencija anti-HBc-a u populaciji DDK-a HZTM-a od 1:19 u 2013. i 1:76 u 2017. godini, značajno je viša od prevalencije DDK-a s OBI-jem, koja je 2013. bila 1:11.213, a 2017. godine 1:30.932. U 98 % svih DDK-a s OBI-jem u Republici Hrvatskoj, u razdoblju od 2013. do 2018. godine, detektiran je anti-HBc (samo 1 DDK nema);
- Iako u istraživanju nije otkriven niti jedan DDK-a s OBI-jem, izračun za ostatni rizik od prijenosa HBV infekcije zaraženim dozama krvi, unatoč svim negativnim rezultatima testiranja, koji se temelji na incidenciji HBV infekcije u višestrukih DDK-a, uključio je i DDK-e s OBI-jem. Ostatni rizik za 2004. godinu iznosi 67 doza/milijun doza ili 1:14.925; za 2013. godinu 88 doza/milijun doza ili 1:11.363; za 2017. godinu 12 doza/milijun doza ili 1:83.333. Ostatni rizik bio je najveći 2013. godine, kada uveden ID-NAT test u testiranju krvi DDK-a, i ima silazni trend;
- Eliminacijom svih anti-HBc pozitivnih trebalo bi nadoknaditi minimalno 1,32 % DDK-a;
- Testiranje samo novih DDK-a bio bi manje učinkovit način u redukciji rizika, jer su: a) u Hrvatskoj OBI evidentirane samo u višestrukih i starijih davatelja (dob 43-67 godina, M 58 godina), b) među novim DDK-ima najviše je mladih već procijepljenih i c) među mlađima od 29 godina prema rezultatima zadnje studije nema anti-HBc pozitivnih;
- U slučaju primjene europskih smjernica koja navode mogućnost prihvaćanju anti-HBc pozitivnih DDK-a s titrom anti-HBs-a višim od 100 IU/L, došlo bi do odbacivanja 472-758 DDK-a godišnje;
- Znanstveni doprinos ovog doktorskog istraživanja zrcali se i u potvrdi važnosti anti-HBc testa u otkrivanju DDK-a s mogućim OBI-jem, u slučajevima intermitentne HBV DNA viremije, te u odlučivanju odabira strategije ispitivanja DDK-a na anti-HBc, uz postojeći panel HBsAg i ID-NAT u Republici Hrvatskoj, što bi bila dodatna mjera u sprječavanju prijenosa HBV-a krvlju i krvnim pripravcima. Donošenje odluke treba poduprijeti daljnjim *cost-benefit* analizama.

6. LITERATURA

- Albarran B, Goncalves L, Salmen S, Borges L, Fields H, Soyano A, Montes H, Berrueta L (2005) Profiles of NK, NKT cell activation and cytokine production following vaccination against hepatitis B. *APMIS*. 113, 526-535.
- Alimonos K, Nafziger AN, Murray J, Bertino JS Jr (1998) Predictions of response to hepatitis B vaccine in health care workers: whose titers of antibody to hepatitis B surface antigen should be determined after a three-dose series, and what are the implications in terms of cost-effectiveness? *Clin Infect Dis*. 26, 566-571.
- Allain JP, Mihaljevic I, Gonzalez-Fraile MI, Gubbe K, Holm-Harritshøj L, Garcia JM, Brojer E, Erikstrup C, Saniewski M, Wernish L, Bianco L, Ullum H, Candotti D, Lelie N, Gerlich WH, Chudy M (2013) Infectivity of blood products from donors with occult hepatitis B virus infection. *Transfusion*. 53, 1405-1415.
- Allain JP, Hewitt PE, Tedder RS, Williamson LM (1999) Evidence that anti-HBc but not HBV-DNA testing may prevent some HBV transmissions by transfusion. *Brit J Haematol*. 107, 186-195.
- Allain JP (2004) Occult Hepatitis B virus infection; implication in transfusion. *Vox Sang*. 86, 83-91.
- Allain JP (2017) Global epidemiology of occult HBV infection. *Ann Blood*. 2:7.
- Almeida JD, Rubenstein D, Slott EJ (1971) New antigen-antibody system in Australia- antigen-positive hepatitis. *Lancet*. 2, 1224-1227.
- Alter HJ, Holland PV, Morrow AG, Purcell RH, Feinstone SM, Moritsugu Y (1975) Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet*. 2, 838-841.
- Alter MJ, Ahtone J, Maynard JE. Hepatitis B virus transmission associated with a multiple-dose vial (1983) *Ann Intern Med*. 99, 330-333.
- Alter MJ (2003) Epidemiology and prevention of hepatitis B. *Semin Liver Dis*. 23, 39-46.
- Babić I, Bingulac-Popović J, Đogić V, Miletić Lovrić M, I. Mihaljević, Stojić Vidović M, Juraković Lončar N, Bališa M, Jukić I (2014) Učestalost i osobitosti okultnog hepatitisa B kod dobrovoljnih davatelja krvi u Republici Hrvatskoj. *Lijec Vjesn*. 136(Suppl 1):57.
- Bartenschlager R, Schaller H (1988) The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription. *EMBO J*. 7, 4185-4192.
- Bartenschlager R, Schaller H (1992) Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *EMBO J*. 11, 3413-3420.
- Bartholomeusz A, Schaefer S (2004) Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. *Rev Med Virol*. 14, 3-16.

- Berting A, Fischer C, Schaefer S, Garten W, Klenk HD, Gerlich WH (2000) Hemifusion activity of a chimeric influenza virus hemagglutinin with a putative fusion peptide from hepatitis B virus. *Virus Res.* 68, 35–49.
- Belloni L, Allweiss L, Guerrieri F, Pediconi N, Volz T, Pollicino T, Petersen J, Raimondo G, Dandri M, Levrero M (2012) IFN- α inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome. *J Clin Invest.* 122, 529–537.
- Beltrami EM, Williams IT, Shapiro CN, Chamberland ME (2000) Risk and management of blood-borne infections in health care workers. *Clin Microbiol Rev.* 13, 385–407.
- Blajchman MA, Bull SB, Feinman SU (1995) Post-transfusion hepatitis: impact of non-A, non-B surrogate test Canadian Post-Transfusion Study Group. *Lancet.* 345, 21–25.
- Block TM, Lu X, Platt FM, Foster GR, Gerlich WH, Blumberg BS, Dwek RA (1994) Secretion of human hepatitis B virus is inhibited by the imino sugar N-butyldeoxynojirimycin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 2235–2239.
- Blumberg BS, Alter HJ (1965) A "New" Antigen in Leukemia Sera. *JAMA.* 191 (7), 541–546.
- Bock CT, Schwinn S, Locarnini S, Fyfe J, Manns MP, Trautwein C, Zentgraf H (2001) Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *J Mol Biol.* 307, 183–196.
- Brechot C, Thiers V, Kremsdorf D, Nalpas B, Pol S, Peterlini-Brechot P (2001) Persistent Hepatitis B Virus Infection in Subjects Without Hepatitis B Surface Antigen: Clinically Significant or Purely "Occult"? *Hepatology.* 34, 194–203.
- Brojer E, Grabarczyk P, Liszewski G, Mikulska M, Allain JP, Letowska M (2006) Characterization of HBV DNA+/HBsAg- blood donors in Poland identified by triplex NAT. *Hepatology.* 44, 1666–1674.
- Brunetto MR, Marcellin P, Cherubini B, Yurdaydin C, Farci P, Hadziyannis SJ, Rothe V, Regop L, Bonino F (2013) Response to peginterferon alfa-2a (40KD) in HBeAg-negative CHB: on-treatment kinetics of HBsAg serum levels vary by HBV genotype. *J Hepatol.* 59, 1153–1159.
- Bruss V, Lu X, Thomssen R, Gerlich WH (1994) Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein. *EMBO J.* 13, 2273–2279.
- Bruss V (1997) A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation. *J Virol.* 71, 9350–9357.
- Busch MP, Dodd RY, Lakritz EM, AuBuchon JP and blood donor study group (1997) Residual value and cost-effectiveness of screening blood donors for antibody to Hepatitis B core antigens a way of detecting window phase human immunodeficiency virus type 1 infections. *Transfusion.* 37,1003-1011.

- Candotti D, Allain JP (2009) Transfusion-transmitted hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 51, 798-809.
- Candotti D, Laperche S (2018) Hepatitis B Virus Blood Screening: Need for Reappraisal of Blood Safety Measures? *Front Med.* 5, 29.
- Candotti D, Boizeau L, Laperche S (2017) Occult hepatitis B infection and transfusion-transmission risk. *Transf Clin Biol.* 24, 189-195.
- Chambers LA, Popovsky MA (1991) Decrease in reported posttransfusion hepatitis. Contributions of donor screening for alanine aminotransferase and antibodies to Hepatitis B core antigen and changes in the general population. *Arch Intern Med.* 151, 2445-2448.
- Chang MH (2000) Natural history of hepatitis B infection in children. *J Gastroenterol Hepatol.* 15(Suppl), E11–E19.
- Chisari FV, Ferrari C (1995) Hepatitis B virus immunopathology. *Springer Semin Immunopathol.* 17, 261–281.
- Chudy M (2013) Infectivity of blood products from donors with occult hepatitis B virus infection. *Transfusion.* 53, 1405-1415.
- Conjeevaram HS, Fong-Lok A (2003) Management of chronic hepatitis B. *J Hepatol.* 38, S90-S103.
- Cooreman MP, Leroux-Roels G, Paulij WP (2001) Vaccine- and hepatitis B immune globulin-induced escape mutations of hepatitis B virus surface antigen. *J Biomed Sci.* 8: 237–247.
- Craxi A, Cooksley WG (2003) Pegylated interferons for chronic hepatitis B. *Antiviral Res.* 60, 87-89.
- Croatian Institute of Public Health. Communicable Diseases in Croatia 2017. Dostupno na: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2018/11/ZBVHR_2017_Final.pdf.
- Crowther RA, Kiselev NA, Böttcher B, Berriman JA, Borisova GP, Ose V, Pumpens P (1994) Threedimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell.* 77, 943–950.
- Dane DS, Cameron CH, Briggs M (1970) Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet.* 1, 695-698.
- Dejean A, Sonigo P, Wain-Hobson S, Tiollais P (1984) Specific hepatitis B virus integration in hepatocellular carcinoma DNA through a viral 11-base-pair direct repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81, 5350–5354.
- Deterding K, Constantinescu I, Nedelcu FD, Gervain J, Nemecek V, Srtuneky O, Vince A, Grgurevic I, Bielawski KP, Zalewska M, Bock T, Ambrozaitis A, Stanczak J, Takács M, Chulanov V, Slusarczyk J, Drazd'áková M, Wiegand J, Cornberg M, Manns MP, Wedemeyer H (2008) Prevalence of HBV genotypes in Central and Eastern Europe. *J Med Virol.* 80, 1707-1711.

- Dettoni S, Candido A, Kondili LA, Chionne P, Taffon S, Genovese D, Iudicone P, Miceli M, Rapisetta M (2009) Identification of low HBV-DNA levels by nucleic acid amplification test (NAT) in blood donors. *J Infect.* 59, 128-133.
- Dickson RC, Everhart JE, Lake JR, Wei Y, Seaberg EC, Wiesner RH, Zetterman RK, Pruett TL, Ishitani MB, Hoofnagle JH (1997) Transmission of Hepatitis B by transplantation of livers from donors positive for antibodies to Hepatitis B core antigen. The National Institute of Diabetes and Kidney Diseases Liver Transplantation Database. *Gastroenterol.* 113, 1668-1674.
- EASL CPG HBV, 2017: European Association for the Study of the Liver (2017) EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 67, 370-398.
- ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). Epidemiological assessment of hepatitis B and C among migrants in the EU/EEA. Stockholm: ECDC; 2016. Dostupno na: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/epidemiological-assessment-hepatitis-B-and-C-amongmigrants-EU-EEA.pdf>.
- Elgouhari HM, Abu-Rajab Tamimi TI, Carey WD (2008) Hepatitis B virus infection: Understanding its epidemiology, course and diagnosis. *Cleve Clin J Med.* 75, 881-889.
- Engelke M, Mills K, Seitz S, Simon P, Gripon P, Schnölzer M, Urban S (2006) Characterization of a hepatitis B and hepatitis delta virus receptor binding site. *Hepatol Baltim Md.* 43, 750-760.
- European Medicines Agency (EMA) 2016. Guideline on epidemiological data on blood transmissible infections. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-epidemiological-data-blood-transmissible-infections-revision-1_en.pdf.
- European Directorate for the Quality of Medicines&HealthCare (EDQM) Report on Collection, Testing and Use of Blood and Blood Components in Europe. Strasbourg: EDQM; 2015. Dostupno na: <https://www.edqm.eu/en/blood-transfusion-reports-70.html>.
- Fattovich G (2003) Natural history of hepatitis B. *J Hepatol.* 39, S50-S58.
- Feitelson MA, Millman I, Halbherr T, Simmons H, BS (1986) A newly identified hepatitis B type virus in tree squirrels. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83, 2233-2237. Féray C, Gigou M, Samuel D, Reyes G, Bernuau J, Reynes M, Bismuth H, Bréchet C (1993) Hepatitis C virus RNA and hepatitis B virus DNA in serum and liver of patients with fulminant hepatitis. *Gastroenterology.* 104, 549-555.
- Fong TL, Di Bisceglie AM, Biswas R, Waggoner JG, Wilson L, Claggett J, Hoofnagle JH (1994) High levels of viral replication during acute hepatitis B infection predict progression to chronicity. *J Med Virol.* 43, 155-158.
- Galbraith RM, Eddleston AL, Williams R, Zuckerman AJ (1975) Fulminant hepatic failure in leukaemia and choriocarcinoma related to withdrawal of cytotoxic drug therapy. *Lancet.* 2, 528-530.

- Ganem D (1991) Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles. *Curr Top Microbiol Immunol.* 168, 61–83.
- Ganem D, Varmus HE (1987) The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem.* 56, 651–693.
- Gavilanes F, Gonzalez-Ros JM, Peterson DL (1982) Structure of hepatitis B surface antigen. Characterization of the lipid components and their association with the viral proteins. *J Biol Chem.* 257, 7770–7777.
- Gerelsaikhan T, Tavis JE, Bruss V (1996) Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis. *J Virol.* 70, 4269–4274.
- Gerlich WH, Bremer C, Saniewski M, Schuettler CG, Wend UC, Willems WR, Glebe D (2010) Occult Hepatitis B virus Infection: Detection and Significance. *Dig Dis.* 28, 116–125.
- Gerlich WH (2013) Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now. *Virol J.* 10, 239–239.
- Gerlich WH, Robinson WS (1980) Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell.* 21, 801–809.
- Gerlich WH, Lürer W (1979) Selective detection of IgM-antibody against core antigen of the hepatitis B virus by a modified enzyme immune assay. *J Med Virol.* 4, 227–238.
- Gessoni G, Beggio S, Barin P, Favarato M, Galli C, Valverde S, Boscolo Nata M, Salvadeo MM, Marchiori G (2014) Significance of anti-HBc only in blood donors: a serological and virological study after hepatitis B vaccination. *Blood Transf.* 12, s63–s68.
- Glebe D (2006) Attachment sites and neutralising epitopes of hepatitis B virus. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 52, 3–21.
- Glebe D, Bremer CM (2013) The molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis.* 33: 103–112.
- Glebe D, Urban S, Knoop EV, Cag N, Krass P, Grün S, Bulavaite A, Sasnauskas K, Gerlich WH (2005) Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes. *Gastroenterology.* 129, 234–245.
- Global Burden of Diseases 2015 Collaborators (2016) Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet.* 388, 1545–1602.
- Grob P, Jilg W, Bornhak H, Gerken G, Gerlich W, Günther S, Hess G, Hüdig H, Kitchen A, Margolis H, Michel G, Trepo C, Will H, Zanetti A, Mushahwar I (2000) Serological pattern "anti-HBc alone": report on a workshop. *J Med Virol.* 62, 450–455.
- Gutiérrez-García ML, Fernandez-Rodriguez CM, Lledo-Navarro JL, Buhigas-Garcia I (2011) Prevalence of occult hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol.* 17, 1538–1542.

- Hadziyannis SJ, Lieberman HM, Karvountzis GG, Shafritz DA (1983) Analysis of liver diseases, nuclear HBcAg, viral replication, and hepatitis B virus DNA in the liver and serum HBeAg Vs. anti-HBe positive carriers of hepatitis B virus. *Hepatology*. 3, 656-662.
- Hauri AM, Armstrong GL, Hutin YJ (2004) The global burden of disease attributable to contaminated injections given in health care settings. *Int J STD AIDS*. 15, 7-16.
- Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H, Gerlich WH (1984) Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol*. 52, 396–402.
- Hill JB, Sheffield JS, Kim MJ, Alexander JM, Sercely B, Wendel GD (2002) Risk of hepatitis B transmission in breast-fed infants of chronic hepatitis B carriers. *Obstet Gynecol*. 99, 1049–1052.
- Hindman SH, Gravelle CR, Murphy BL, Bradley DW, Budge WR, Maynard JE (1976) „e“ antigen, Dane particles and serum DNA polymerase activity in HBsAg carriers. *Ann Intern Med*. 85, 458-460.
- Hirsch RC, Lavine JE, Chang LJ, Varmus HE, Ganem D (1990) Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as well as for reverse transcription. *Nature*. 344, 552–555.
- Hoofnagle JH, Seeff LB, Bales ZB, Zimmerman HJ (1978) Type B hepatitis after transfusion with blood containing antibody to hepatitis B core antigen. *N Engl J Med*. 298, 1379-1383.
- Hourfar MK, Walch LA, Geusendam G, Dengler T, Janetzko K, Gubbe K, Frank K, Karl A, Löhr M, Sireis W, Seifried E, Schmidt M (2009) Sensitivity and specificity of Anti-HBc screening assays--which assay is best for blood donor screening? *Int J Lab Hematol*. 31, 649-656.
- Hruska JF, Clayton DA, Rubenstein JL, Robinson WS (1977) Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after the Dane particle DNA polymerase reaction. *J Virol*. 21, 666–672.
- Hu J, Seeger C (1996) Hsp90 is required for the activity of a hepatitis B virus reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93, 1060–1064.
- Hu J, Toft DO, Seeger C (1997) Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multicomponent chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids. *EMBO J*. 16, 59–68.
- Huang J, Liang TJ (1993) A novel hepatitis B virus (HBV) genetic element with Rev response elementlike properties that is essential for expression of HBV gene products. *Mol Cell Biol*. 13, 7476–7486.
- Huang CH, Yuan Q, Chen PJ, Zhang YL, Chen CR, Zheng QB, Yeh SH, Yu H, Xue Y, Chen YX, Liu PG, Ge SX, Zhang J, Xia NS (2012) Influence of mutations in hepatitis B virus surface protein on viral antigenicity and phenotype in occult HBV strains from blood donors. *J Hepatol*. 57, 720-729.

- Huovila AP, Eder AM, Fuller SD (1992) Hepatitis B surface antigen assembles in a post-ER, pre-Golgi compartment. *J Cell Biol.* 118, 1305–1320.
- Hutin YJ, Goldstein ST, Varma JK, O'Dair JB, Mast EE, Shapiro CN, Alter MJ (1999) An outbreak of hospital-acquired hepatitis B virus infection among patients receiving chronic hemodialysis. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 20, 731-735.
- Inoue T, Tanaka Y (2016) Hepatitis B virus and its sexually transmitted infection - an update. *Microb Cell.* 3, 420–437.
- ISBT TTID WORKING PARTY “HBV safety” study-group. Characterization of “occult” HBV yield cases identified by NAT (ID or small pool) or anti-HBc screening. Dostupno na: http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/files-2015/ttid/Virology/HBV%20Safety/HBV%20Safety%20presentations/occult%20HBV%20yield%20cases%20by%20ID-NAT%20or%20anti-HBc%20screening%20HBV%20Safety%20protocol%20TTID.pdf
- Jaoudé GA, Sureau C (2005) Role of the antigenic loop of the hepatitis B virus envelope proteins in infectivity of hepatitis delta virus. *J Virol.* 79, 10460–10466.
- Juhl D, Knobloch JK-M, Görg S, Hennig H (2016) Comparison of Two Test Strategies for Clarification of Reactive Results for Anti-HBc in Blood Donors. *Transfus Med Hemother.* 43, 37-43.
- Jung MC, Pape GR (2002) Immunology of Hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis.* 2002, 43-50.
- Junker-Niepmann M, Bartenschlager R, Schaller H (1990) A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *EMBO J.* 9, 3389–3396.
- Kaneko S, Miller RH (1988) X-region-specific transcript in mammalian hepatitis B virus-infected liver. *J Virol.* 62, 3979–3984.
- Kann M, Sodeik B, Vlachou A, Gerlich WH, Helenius A (1999) Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J Cell Biol.* 145, 45–55.
- Kao JH (2008) Diagnosis of hepatitis B virus infection through serological and virological Markers. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2, 553-562
- Katchaki JN, Siem TH, Brouwer R, Brandt KH, and van den Waart M (1980) Detection and significance of anti HBc in the blood bank; preliminary results of controlled prospective study. *J Virol Methods.* 2, 119-125.
- Katsoulidou A, Paraskevis D, Magiorkinis E, Moschidis Z, Haida C, Hatzitheodorou E, Varaklioti A, Karafoulidou A, Hatzitaki M, Kavallierou L, Mouzaki A, Andrioti E, Veneti C, Kaperoni A, Zervou E, Politis C, Hatzakis A (2009) Molecular characterization of occult hepatitis B cases in Greek blood donors. *J Med Virol.* 81, 815-825.

- Kay A, Zoulim F (2007) Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus Res.* 127, 164-176.
- Kenney JM, von Bonsdorff CH, Nassal M, Fuller SD (1995) Evolutionary conservation in the hepatitis B virus core structure: comparison of human and duck cores. *Struct Lond Engl.* 3, 1009–1019.
- Kew MC (2011) Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 26(Suppl 1), 144-152.
- Korelitz JJ, Busch MP, Kleinman SH, Williams AE, Zuck TF, Gilcher RO, Ownby HE, Co Chien H, Nemo GJ (1996) Relationship between antibodies to Hepatitis B core antigen and retroviral infection in blood from volunteer donors. *Transfusion.* 36, 232-237.
- Kuhns MC, Busch MP (2006) New strategies for blood donor screening for hepatitis B virus: nucleic acid testing versus immunoassay methods. *Mol Diagn Ther.* 10, 77-91.
- Köck J, Schlicht HJ (1993) Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity. *J Virol.* 67, 4867–4874.
- Lambert C, Döring T, Prange R (2007) Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and gamma 2-adaptin. *J Virol.* 81, 9050–9060.
- Landers TA, Greenberg HB, Robinson WS (1977) Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction. *J Virol.* 23, 368–376.
- Lau JYN, Wright TL (1993) Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet.* 342, 1335 – 1340.
- Lazarević I (2014) Clinical implications of hepatitis B virus mutations: recent advances. *World J Gastroenterol.* 20, 7653-7664.
- Leistner CM, Gruen-Bernhard S, Glebe D (2008) Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cell Microbiol.* 10, 122–133.
- Lee WM (1997) Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med.* 337, 1733-1745.
- Lelie N, Bruhn R, Busch M, Vermeulen M, Tsoi W-C, Kleinman S, and the International NAT Study group (2017) 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.* 57, 24-35.
- Lien JM, Aldrich CE, Mason WS (1986) Evidence that a capped oligoribonucleotide is the primer for duck hepatitis B virus plus-strand DNA synthesis. *J Virol.* 57, 229–236.
- Lieshout-Krikke RW, Molenaar-de Backer MW, Swieten P, Zaaijer HL (2014) Surface antigen-negative hepatitis B virus infection in Dutch blood donors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 33, 69-77.

- Ling CM, Overby LR (1972) Prevalence of hepatitis B virus antigen as revealed by direct radioimmune assay with 125 I-antibody. *J Immunol.* 109, 834-841.
- Locarnini S (2005) Molecular virology and the development of resistant mutants: implications for therapy. *Semin Liver Dis.* 25(Suppl 1), 9-19.
- Lok AS, Zoulim F, Dusheiko G, Ghany MG (2017) Hepatitis B cure: From discovery to regulatory approval. *J Hepatol.* 67, 847-861.
- Makroo RN, Chowdhry M, Bhatia A, Arora B, Rosamma NL (2012) Hepatitis B core antibody testing in Indian blood donors: A double-edged sword! *Asian J Transf Sci.* 6, 10-13.
- Magnius LO, Espmark A (1972) A new antigen complex co-occurring with Australia antigen. *APMIS.* 80, 335-337.
- Marinos G, Smith HM, Naoumov NV, Williams R (1994) Quantitative assessment of serum IgM anti-HBc in the natural course and during interferon treatment of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatol.* 19, 303-311.
- McMahon BJ, Alward WLM, Hall DB, Heyward WL, Bender TR, Francis DP, Maynard JE (1985) Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. *J Infect Dis.* 151, 599–603.
- Mihaljević I, Lovrić M, Babić I, Dražić V, Bališa M, Jukić I (2007) Incidence of Anti-HBc in the Population of Croatian Blood Donors. The AABB 2007 Annual Meeting & TXPO, Anaheim, October 20-23, 2007, California. *Transfusion.* 47(Suppl):99A.
- Mihaljevic I, Ivankovic E, Drenjancevic D, Jaklin G, Lukezic N, Babić I, Bingulac-Popovic J, Miletić Lovrić M, Stojic Vidovic M, Topic Sestan P, samardzija M, Vuk T (2014) HBV-OBI look-back pro and contra? *Vox Sang.* 107(Suppl 1), 41-42.
- Milich DR, Liang TJ (2003) Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology.* 38, 1075-1086.
- Milich DR, Thornton GB, Neurath AR, Kent SB, Michel ML, Tiollais P, Chisari FV (1985) Enhanced immunogenicity of the pre-S region of hepatitis B surface antigen. *Science.* 228, 1195–1199.
- Milich DR, McLachlan A (1986) The nucleocapsid of hepatitis B virus is both a T-cell independent and T-cell dependent antigen. *Science.* 234, 1398-1401.
- Miletić M, Bingulac-Popović J, Stojić Vidović M, Hećimović A, Berendika M, Babić I, Đogić V, Samaržija M, Barišić K, Jukić I, Mihaljević I. Anti-HBc prevalence among Croatian blood donors in a 14-year period (2004-2017): assessment of trends, risks and need for implementing routine testing, *Transfus Clin Biol*, doi: 10.1016/j.tracli.2019.05.001.
- Miller RH, Marion PL, Robinson WS (1984) Hepatitis B viral DNA-RNA hybrid molecules in particles from infected liver are converted to viral DNA molecules during an endogenous DNA polymerase reaction. *Virology.* 139, 64–72.

- Minegishi K, Yoshikawa A, Kishimoto S, Yugi H, Yokoya N, Sakurada M, Kiyokawa H, Nishioka K, the Japanese Red Cross NAT Screening Research Group (2003) Superiority of minipool nucleic acid amplification technology for hepatitis B virus over chemiluminescence immunoassay for hepatitis B surface antigen screening. *Vox Sang.* 84, 287–291.
- Mohr C (2014) Influence of Hepatitis B Virus Surface Protein Variants Associated with Antiviral Resistance on Viral Assembly and Secretion of Hepatitis B and Hepatitis D Viruses. Angefertigt am Institut für Medizinische Virologie Nationales Referenzzentrum für Hepatitis-B- und D-Viren der Justus-Liebig-Universität Gießen. Dostupno na: <https://docplayer.net/1067617-Angefertigt-am-institut-fur-medizinische-virologie-nationales-referenzzentrum-fur-hepatitis-b-und-d-viren-der-justus-liebig-universitat-giessen.html>.
- Neurath AR, Kent SB, Parker K, Prince AM, Strick N, Brotman B, Sproul P (1986a) Antibodies to a synthetic peptide from the preS 120-145 region of the hepatitis B virus envelope are virus neutralizing. *Vaccine.* 4, 35–37.
- Newbold JE, Xin H, Tencza M, Sherman G, Dean J, Bowden S, Locarnini S (1995) The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *J Virol.* 69, 3350-3357.
- Niederhauser C (2011) Reducing the risk of hepatitis B virus transfusion-transmitted infection. *J Blood Med.* 2, 91–102.
- Norder H, Couroucé A-M, Coursaget P, Echevarria JM, Lee S-D, Mushahwar IK, Robertson BH, Locarnini S, Magnius LO (2004) Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology.* 47, 289–309.
- Nowak MA, Bonhoeffer S, Hill AM, Boehme R, Thomas HC, McDade H (1996) Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 4398-4402.
- O'Brian SF, Fearon MA, Yi QL, Fan W, Scalia V, Muntz IR, Vamvakas EC (2007) Hepatitis virus DNA-positive, Hepatitis HBsAg-negative blood donations intercepted by anti-hepatitis B core antigen testing: Canadian Blood service experience. *Transfusion.* 47, 1809-1815.
- Pasek M, Goto T, Golbert W, Zink B, Schaller H, MacKay P, Leadbetter G, Murray K (1979) Hepatitis B virus genes and their expression in *E. coli*. *Nature.* 280, 815-819.
- Patzer EJ, Nakamura GR, Simonsen CC, Levinson AD, Brands R (1986) Intracellular assembly and packaging of hepatitis B surface antigen particles occur in the endoplasmic reticulum. *J Virol.* 58, 884–892.
- Persing DH, Varmus HE, Ganem D (1987) The preS1 protein of hepatitis B virus is acylated at its amino terminus with myristic acid. *J Virol.* 61, 1672–1677.
- Peterson DL (1981) Isolation and characterization of the major protein and glycoprotein of hepatitis B surface antigen. *J Biol Chem.* 256, 6975–6983.

- Polizzotto MN, Wood EM, Ingham H, Keller AJ; Australian Red Cross Blood Service Donor and Product Safety Team (2008) Reducing the risk of transfusion-transmissible viral infection through blood donor selection: the Australian experience 2000 through 2006. *Transfusion*. 48, 55-63.
- Prince AM (1968) An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Pathology*. 60, 814-821.
- Rabe B, Glebe D, Kann M (2006) Lipid-mediated introduction of hepatitis B virus capsids into nonsusceptible cells allows highly efficient replication and facilitates the study of early infection events. *J Virol*. 80, 5465–5473.
- Rabe B, Vlachou A, Panté N, Helenius A, Kann M (2003) Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100, 9849–9854.
- Raimondo G, Allain JP, Brunetto MR, Buendia MA, Chen DS, Colombo M, Craxi A, Donato F, Ferrari C, Gaeta GB, Gerlich WH, Levrero M, Locarnini S, Michalak T, Mondelli MU, Pawlotsky JM, Pollicino T, Prati D, Puoti M, Samuel D, Shouval D, Smedile A, Squadrito G, Trépo C, Villa E, Will H, Zanetti AR, Zoulim F (2008) Statement from the Taormina Expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 49, 652-657.
- Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, Squadrito G (2007) Occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 46, 160-170.
- Raimondo G, Locarnini S, Pollicino T, Levrero M, Zoulim F, Lok AS; Taormina Workshop on Occult HBV Infection Faculty Members (2019) Update of the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 71, 397-408.
- Rall LB, Standring DN, Laub O, Rutter WJ (1983) Transcription of hepatitis B virus by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*. 3, 1766–1773.
- Reijneveld S (2003) Age in epidemiological analysis. *J Epidemiol Community Health*. 58, 397.
- Rodella A, Galli C, Terlenghi L, Perandin F, Bonfanti C, Manca N (2006) Quantitative analysis of HBsAg, IgM anti-HBc and anti-HBc avidity in acute and chronic hepatitis B. *J Clin Virol*. 37, 206-212.
- Romano L, Velati C, Cambiè G, Fomiatti L, Galli C, Zanetti AR, SIMTI study group for HBV infection among first-time blood donors (2013) Hepatitis B virus infection among first-time blood donors in Italy: prevalence and correlates between serological patterns and occult infection. *Blood Transfus*. 11, 281-288.
- Roth WK, Busch MP, Schuller A, Ismay S, Cheng A, Seed CR, Jungbauer C, Minsk PM, Sondag-Thull D, Wendel S, Levi JE, Fearon M, Delage G, Xie Y, Jukic I, Turek P, Ullum H, Tefanova V, Tilk M, Reimal R, Castren J, Naukkarinen M, Assal A, Jork C, Hourfar MK, Michel P, Offergeld R, Pichl L, Schmidt M, Schottstedt V, Seifried E, Wagner F, Weber-Schehl M, Politis C, Lin CK, Tsoi WC, O'Riordan J, Gottreich A, Shinar E, Yahalom V, Velati C, Satake M, Sanad N, Sisene I, Bon AH, Koppelman M, Flanagan P, Flesland O, Brojer E, Lęowska M, Nascimento F, Zhiburt E, Chua SS, Teo D, Stezinar SL, Vermeulen M, Reddy R, Park Q, Castro E, Eiras A, Gonzales Fraile I, Torres P, Ekermo B, Niederhauser

- C, Chen H, Oota S, Brant LJ, Eglin R, Jarvis L, Mohabir L, Brodsky J, Foster G, Jennings C, Notari E, Stramer S, Kessler D, Hillyer C, Kamel H, Katz L, Taylor C, Panzer S, Reesink HW (2012) International survey on NAT testing of blood donations: expanding implementation and yield from 1999 to 2009. *Vox Sang.* 102, 82-90.
- Safic Stanic H, Babic I, Maslovic M, Dogic V, Bingulac-Popovic J, Miletic M, Jurakovic-Loncar N, Vuk T, Strauss-Patko M, Jukic I (2017) Three-Year Experience in NAT Screening of Blood Donors for Transfusion Transmitted Viruses in Croatia. *Transf Med Hemother.* 44,415-420.
- Satake M, Taira R, Yugi H, Kenemitsu K, Ikeda H, Tadokoro K (2007) Infectivity of blood components with low hepatitis B virus DNA levels identified in a lookback program. *Transfusion.* 47, 1197-1205.
- Scheiblauer H, El-Nageh M, Diaz S, Nick S, Zeichhardt H, Grunert H-P&Prince A (2010) 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.* 98, 403–414.
- Schlicht HJ, Schaller H (1989) Analysis of hepatitis B virus gene functions in tissue culture and in vivo. *Curr Top Microbiol Immunol.* 144, 253–263
- Schmitt S, Glebe D, Alving K, Tolle TK, Linder M, Geyer H, Linder D, Peter-Katalinic J, Gerlich WH, Geyer R (1999) Analysis of the pre-S2 N- and O-linked glycans of the M surface protein from human hepatitis B virus. *J Biol Chem.* 274, 11945–11957.
- Schulze A, Gripon P, Urban S (2007) Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-independent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatol Baltim Md.* 46, 1759–1768.
- Seed CR, Kiely P, Hoad VC, Keller AJ (2017) Refining the risk estimate for transfusion-transmission of occult hepatitis B virus. *Vox Sang.* 112, 3–8.
- Seed, CR, Kiely, P (2013) A method for estimating the residual risk of transfusion-transmitted HBV infection in a donor population without universal anti-HBc screening. *Vox Sang.* 105, 290-298.
- Seed CR, Maloney R, Kiely P, Bell B, Keller AJ, Pink J; Blood Service Medical Services Lookback Team (2015) Infectivity of blood components from donors with occult hepatitis B infection - results from an Australian lookback programme. *Vox Sang.* 108, 113-122.
- Seeger C (1991) Hepadnavirus replication. U knjizi *Molecular Biology of the Hepatitis B Virus.* 213-226.
- Seeger C, Maragos J (1989) Molecular analysis of the function of direct repeats and a polypurine tract for plus-strand DNA priming in woodchuck hepatitis virus. *J Virol.* 63, 1907–1915.
- Seeger C, Mason WS (2000) Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64, 51-68.

- Seifer M, Standring DN (1993) Recombinant human hepatitis B virus reverse transcriptase is active in the absence of the nucleocapsid or the viral replication origin, DR1. *J Virol.* 67; 4513-4520.
- Seo DH, Whang DH, Song EY, Han KS (2015) Occult hepatitis B virus infection and blood transfusion. *World J Hepatol.* 7, 600-606.
- Le Seyec J, Chouteau P, Cannie I, Guguen-Guillouzo C, Gripon P (1998) Role of the pre-S2 domain of the large envelope protein in hepatitis B virus assembly and infectivity. *J Virol.* 72, 5573–5578.
- Shikata T, Karasawa T, Abe K, Uzawa T, Suzuki H, Oda T, Imai M, Mayumi M, Moritsugu Y (1977) Hepatitis B e antigen and infectivity of hepatitis B virus. *J Infect Dis.* 136, 571-576.
- Siddiqui A, Sattler F, Robinson WS (1979) Restriction endonuclease cleavage map and location of unique features of the DNA of hepatitis B virus, subtype adw2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76, 4664–4668.
- Slot E, Janssen MP, Marijt-van der Kreek T, Zaaijer HL, van de Laar TJ (2016) Two decades of risk factors and transfusion-transmissible infections in Dutch blood donors. *Transfusion.* 56, 203-214.
- Simon TL, Bankhurst AD (1984) Pilot study of surrogate test to prevent transmission of acquired immune deficiency syndrome by transfusion. *Transfusion.* 24, 373-378.
- Smedile A, Farci P, Verme G, Caredda F, Cargnel A, Caporaso N, Dentico P, Trepo C, Opolon P, Gimson A, Vergani D, Williams R, Rizzetto M (1982) Influence of delta infection on severity of hepatitis B. *Lancet.* 2, 945–947.
- Song JE, Kim DY (2016) Diagnosis of hepatitis B. *Ann Transl Med.* 4, 338.
- Song LW, Liu PG, Liu CJ, Zhang TY, Cheng XD, Wu HL, Yang HC, Hao XK, Yuan Q, Zhang J, Kao JH, Chen DS, Chen PJ, Xia NS (2014) Quantitative hepatitis B core antibody levels in the natural history of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Infect.* 21, 197-203.
- Stojić Vidović M, Miletić Lovrić M, Mihaljević I (2014) Analiza demografskih obilježja davatelja krvi HZTM u odnosu na HBV, HCV, HIV i sifilis infekciju. *Lijec vjesn.* 136 (Suppl 1), 52-53.
- Stramer SL, Zou S, Notari EP, Foster GA, Krysztof DE, Musavi F, Dodd RY (2012) Blood donation screening for hepatitis B virus markers in the era of nucleic acid testing: are all tests of value? *Transfusion.* 52, 440-446.
- Stramer SL, Wend U, Candotti D, Foster GA, Hollinger FB, Dodd RD, Allain J-P, Gerlich W (2011) Nucleic Acid testing to Detect HBV Infection in Blood Donors. *N Engl J Med.* 364, 236-247.
- Summers J, Mason WS (1982) Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell.* 29, 403–415.

- Summers J, O'Connell A, Millman I (1975) Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 72, 4597-4601.
- Sung JJY, Tsui SKW, Tse CH, Ng EYT, Leung KS, Lee KH, Mok TSK, Bartholomeusz A, Au TCC, Tsoi KKF, Locarnini S, Chan HLY (2008) Genotype-specific Genomic Markers of Associated with Primary Hepatomas, Based on Complete Genomic Sequencing of Hepatitis B virus. *J Virol*. 2, 3604-3611.
- Stevens CE, Beasley RP, Tsui J, Lee WC (1975) Vertical transmission of hepatitis B antigen in Taiwan. *N Engl J Med*. 292, 771-774.
- Stibbe W, Gerlich WH (1982) Variable protein composition of hepatitis B surface antigen from different donors. *Virology*. 123, 436-442.
- Svicher V, Cento V, Bernassola M, Neumann-Fraune M, VanHemert F, Chen M, Salpini R, Liu C, Longo R, Visca M, Romano S, Micheli V, Bertoli A, Gori C, Ceccherini-Silberstein F, Sarrecchia C, Andreoni M, Angelico M, Ursitti A, Spanò A, Zhang JM, Verheyen J, Cappiello G, Perno CF (2012) Novel HBsAg markers tightly correlate with occult HBV infection and strongly affect HBsAg detection. *Antiviral Res*. 93, 86-93.
- Taira R, Satake M, Momose S, Hino S, Suzuki Y, Murokawa H, Uchida S, Tadokoro K (2013) Residual risk of transfusion-transmitted hepatitis B virus (HBV) infection caused by blood components derived from donors with occult HBV infection in Japan. *Transfusion*. 53, 1393-1404.
- Tang H, Banks KE, Anderson AL, McLachlan A (2001) Hepatitis B virus transcription and replication. *Drug News Perspect*. 14, 325-334.
- Tiollais P, Pourcel C, Dejean A (1985) The hepatitis B virus. *Nature*. 317, 489-495.
- Torbenson M, Thomas DL (2002) Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis*. 2, 479-486.
- Tuttleman JS, Pugh JC, Summers JW (1986) In vitro experimental infection of primary duck hepatocyte cultures with duck hepatitis B virus. *J Virol*. 58, 17-25.
- Van de Laar TJ, van der Kreek TM, Molenaar-de Backer MW, Hogema B, Zaaier HL (2015) et al. The yield of universal antibody to hepatitis B core antigen donor screening in the Netherlands, a hepatitis B virus low-endemic country. *Transfusion*. 55, 1206-1213.
- Velati C, Romanò L, Fomiatti L, Baruffi L, Zanetti AR (2008) Impact of nucleic acid testing for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus on the safety of blood supply in Italy: a 6-year survey. *Transfusion*. 48, 2205-2213.
- Wang J, Lee AS, Ou JH (1991) Proteolytic conversion of hepatitis B virus e antigen precursor to end product occurs in a postendoplasmic reticulum compartment. *J Virol*. 65, 5080-5083.
- Wang XW, Gibson MK, Vermeulen W, Yeh H, Forrester K, Stürzbecher HW, Hoeijmakers JH, Harris CC (1995) Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene. *Cancer Res*. 55(24), 6012-6016.

- Wieland SF, Guidotti LG, Chisari FV (2000) Intrahepatic induction of alpha/beta interferon eliminates viral RNA-containing capsids in hepatitis B virus transgenic mice. *J Virol.* 74, 4165-4173.
- Wieland SF, Eustaquio A, Whitten-Bauer C, Boyd B, Chisari FV (2005) Interferon prevents formation of replication-competent hepatitis B virus RNA-containing nucleocapsids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 9913-9917.
- Will H, Reiser W, Weimer T, Pfaff E, Büscher M, Sprengel R, Cattaneo R, Schaller H (1987) Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol.* 61, 904–911.
- WHO 2017. Global Hepatitis Report, 2017. Dostupno na: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255016/9789241565455-eng.pdf;jsessionid=7D0A99A714452CF2A9D113609D93A8C9?sequence=1>; pristupljeno 1. travnja 2019.
- WHO 2017. Global Status Report on Blood Safety and Availability 2016. Dostupno na: <https://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254987/1/9789241565431-eng.pdf>.
- Wong GL, Wong VW, Chan HL (2014) Combination therapy of interferon and nucleotide/nucleoside analogues for chronic hepatitis B. *J Viral Hepat.* 21, 825-834.
- Wright TL, Mamish D, Combs C, Kim M, Donegan E, Ferrell L, Lake J, Roberts J, Ascher NL (1992) Hepatitis B virus and apparent fulminant non-A, non-B hepatitis. *Lancet.* 339, 952–955.
- Wynne SA, Crowther RA, Leslie AGW (1999) The Crystal Structure of the Human Hepatitis B Virus. *Mol Cell.* 3, 771–780.
- Yan Y, Xu D (1999) The role of placenta in hepatitis B virus intrauterine transmission. *Chin J Obstet Gynecol.* 34, 392-395.
- Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, Qi Y, Peng B, Wang H, Fu L, Song M, Chen P, Gao W, Ren B, Sun Y, Cai T, Feng X, Sui J, Li W (2012) Sodiumtaurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife.* 1, e00049.
- Ye X, Li T, Xu X, Du P, Zeng J, Zhu W, Yang B, Li C, Allain JP (2017) Characterisation and follow-up study of occult hepatitis B virus infection in anti-HBc-positive qualified blood donors in southern China. *Blood Transfus.* 15, 6-12.
- Yilmaz S, Unlu A, Cetinkaya RA, Yapar M, Avci IY, Yilmaz S, Eyigun CP (2016) A strategical re-thinking on National Blood Donor Pool: Anti-HBc positivity related re-entry mechanisms. *Transfus Apher Sci.* 54:271-275.
- Yuan Q, Ou SH, Chen CR, Ge SX, Pei B, Chen QR, Yan Q, Lin YC, Ni HY, Huang CH, Yeo AE, Shih JW, Zhang J, Xia NS (2010) Molecular characteristics of occult hepatitis B virus from blood donors in southeast China. *J Clin Microbiol.* 48, 357-362.

- Yuan Q, Song L-W, Cavallone D, Moriconi F, Cherubini B, Colombatto P, Oliveri F, Coco BA, Ricco G, Bonino F, Shih JW, Xia NS, Brunetto MR. (2015) Total Hepatitis B Core Antigen Antibody, a Quantitative Non-Invasive Marker of Hepatitis B Virus Induced Liver Disease. *PLoS ONE*. 10, e0130209.
- Zerbini A, Pilli M, Boni C, Fisicaro P, Penna A, Di Vincenzo P, Giuberti T, Orlandini A, Raffa G, Pollicino T, Raimondo G, Ferrari C, Missale G (2008) The characteristics of the cell-mediated immune response identify different profiles of occult hepatitis B virus infection. *Gastroenterol*. 134, 1470–1481.
- Zhu HL, Li X, Li J, Zhang ZH (2016) Genetic variation of occult hepatitis B virus infection. *World Gastroenterol*. 22, 3531-3546.

7. PRILOG

Ovaj prilog sadrži 2 znanstvena rada objavljena u časopisima zastupljenim u bazama Current Contents koji obrađuju problematiku iznesenu u ovom doktorskom radu.

Znanstveni rad prihvaćen za objavljivanje 02.05.2019. u časopisu Transfusion Clinique et Biologique:

- **Manuela Miletić**, Jasna Bingulac-Popović, Miljana Stojić Vidović, Ana Hećimović, Mirka Berendika, Ivana Babić, Vesna Đogić, Marko Samardžija, Karmela Barišić, Irena Jukić, Ivanka Mihaljević. Anti-HBc prevalence among Croatian blood donors in a 14-year period (2004-2017): assessment of trends, risks and need for implementing routine testing. doi: 10.1016/j.traccli.2019.05.001, *elektronička objava prije tiskane*

Znanstveni rad:

- Hana Safic Stanic, Ivana Babic, Margareta Maslovic, Dogic Vesna, Jasna Bingulac-Popovic, **Manuela Miletic**, Nina Jurakovic-Loncar, Tomislav Vuk, Maja Strauss-Patko, Irena Jukic. Three-year experience in NAT screening of blood donors for transfusion transmitted viruses in Croatia. Transfusion Medicine and Hemotherapy 2017; 44: 1-6.



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com



Original article

Anti-HBc prevalence among Croatian blood donors in a 14-year period (2004–2017): Assessment of trends, risks and need for implementing routine testing

Prévalence anti-HBc chez les donneurs de sang croates sur une période de 14 ans (2004–2017) : tendances, infectiosité, risques résiduels, OBI et nécessité du dépistage

Manuela Miletić^{a,*}, Jasna Bingulac-Popović^a, Miljana Stojić Vidović^a, Ana Hećimović^a, Mirka Berendika^b, Ivana Babić^a, Vesna Đogić^a, Marko Samardžija^c, Karmela Barišić^d, Irena Jukić^a, Ivanka Mihaljević^a

^a Croatian Institute of Transfusion Medicine (CITM), Petrova 3, 10000 Zagreb, Croatia

^b Abbott Diagnostic Croatia, Koranska 2, 10000 Zagreb, Croatia

^c Clinical Hospital Osijek, Huttlerova 4, 31000 Osijek, Croatia

^d Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

ARTICLE INFO

Article history:
Available online xxx

Keywords:
Blood donors
Anti-HBc seroprevalence
OBI

ABSTRACT

Objectives. – The anti-HBc prevalence over a 14-years period (2004–2017), trends, infectivity, residual risk, and need for testing in blood donors (BD) of the Croatian Institute of Transfusion Medicine were assessed.

Material and methods. – Anti-HBc was tested in 19,969 BD serum samples collected in 2004 ($N=7561$), 2013 ($N=7338$) and 2017 ($N=5090$). All serums were initially screened for HBsAg, anti-HCV, HIV Ag/Ab, and anti-TP. 2013 and 2017 samples were also tested by ID-NAT.

Results. – Over a 14-years period, the anti-HBc prevalence significantly decreased among Croatian BD (5.2% in 2004, 2.56% in 2013, and 1.32% in 2017). Similarly, the prevalence of anti-HBc-only profiles decreased from 0.62% in 2004, 0.25% in 2013, and 0.21% in 2017. The 4-time decreasing trend was observed in all age groups of BD from 2017 but mostly among repeat donors (5.90% to 1.38%). First-time donors showed no significant difference in anti-HBc prevalence probably due to their younger age (<29 years) and HBV vaccine status. However, similar anti-HBs carriage rates (80.56%, 87.57%, and 82.09%) were reported in anti-HBc positive donors over the study period. HBsAg and HBV DNA were not detected. No OBI infection was found in the study despite an OBI frequency of 1:10,900 donations previously reported in Croatia. A HBV decreasing residual risks of 68, 88, and 12 per million donations were estimated for years 2004, 2013, and 2017, respectively.

Conclusion. – Anti-HBc testing is an additional measure of preventing HBV infection by transfusion. Implementation of anti-HBc testing will result in the deferral of 1.3% BD and should be supported by cost-benefit analyses.

© 2019 Société française de transfusion sanguine (SFTS). Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

R É S U M É

Buts/Objectifs. – La prévalence anti-HBc, ses tendances évolutives dans le temps, l'infectiosité, le risque résiduel infectieux et la nécessité du dépistage ont été évalués sur une période de 14 ans (2004–2017) chez les donneurs de sang (DS) de l'Institut croate de médecine transfusionnelle.

Mots clés :
Donneurs de sang
Séroprévalence anti-HBc
OBI

* Corresponding author: Croatian Institute of Transfusion Medicine (CITM), Petrova 3, 10000 Zagreb, Croatia.

E-mail addresses: manuela.miletic@hztm.hr (M. Miletić), jasna.bingulac-popovic@hztm.hr (J. Bingulac-Popović), miljana.stojic.vidovic@hztm.hr (M. Stojić Vidović), ana.hecimovic@hztm.hr (A. Hećimović), mirka.berendika@abbott.com (M. Berendika), ivana.babic@hztm.hr (I. Babić), vesna.dogic@hztm.hr (V. Đogić), drmarkosamardzija@gmail.com (M. Samardžija), karmela.barisc@pharma.hr (K. Barišić), irena.jukic@hztm.hr (I. Jukić), imihalj263@gmail.com (I. Mihaljević).

<https://doi.org/10.1016/j.traccli.2019.05.001>

1246-7820/© 2019 Société française de transfusion sanguine (SFTS). Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Miletić M, et al. Anti-HBc prevalence among Croatian blood donors in a 14-year period (2004–2017): Assessment of trends, risks and need for implementing routine testing. Transfusion Clinique et Biologique (2019), <https://doi.org/10.1016/j.traccli.2019.05.001>

Matériels et méthodes. – Un nombre total de 19 969 échantillons de sérum de DS (7561, 7318 et 5090 collectés en 2004, 2013 et 2017, respectivement) ont été testés pour l'anti-HBc après dépistage obligatoire de l'AgHBs, des anti-VHC, des Ag/Ac VIH et des anti-TP en 2004, et introduction du dépistage des génomes viraux en dons individuels (ID-NAT).

Résultats. – Sur une période de 14 ans, la prévalence des anti-HBc a significativement diminué chez les DS croates (5,24 % en 2004, 2,56 % en 2013 et 1,32 % en 2017). La prévalence du profil anti-HBc isolé a diminué de façon similaire, passant de 0,62 % en 2004 à 0,25 % en 2013 et à 0,21 % en 2017. La tendance à la baisse d'un facteur 4 a été observée dans tous les groupes d'âge de DS en 2017, mais principalement chez les donneurs réguliers (de 5,90 % à 1,38 %). Aucune différence significative de la prévalence anti-HBc n'a été observée chez les nouveaux donneurs, probablement en raison de leur plus jeune âge (<29 ans) et de leur statut vaccinal. Cependant, des prévalences anti-HBs similaires (80,56 %, 87,57 % et 82,09 %) ont été observées chez les donneurs anti-HBc positifs au cours de la période d'étude. L'AgHBs et l'ADN VHB n'ont pas été détectés, excluant toute infection OBI malgré une fréquence de ce type d'infection de 1:10 900 dons précédemment décrite en Croatie. Des risques infectieux VHB résiduels de 68, 88 et 12 par million de dons ont été respectivement estimés pour les années 2004, 2013 et 2017.

Conclusion. – Le dépistage anti-HBc est une mesure supplémentaire de prévention de la transmission par transfusion de l'infection VHB. La mise en œuvre du dépistage anti-HBc entraînera l'exclusion supplémentaire de 1,3 % des donneurs et doit être étayée par des analyses de coût-efficacité.

© 2019 Société française de transfusion sanguine (SFTS). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

1. Introduction

The risk of transfusion-transmitted hepatitis B virus (HBV) infection is very low but remains higher than the transmission risk associated with other viruses for which mandatory testing is also in place [1]. This difference in transfusion-transmission risk may be related to the variability of the clinical presentation of HBV infection and the associated host's immune responses, the viral replication and serological markers dynamics that makes both the selection of blood donors and testing more difficult. Which tests are to be used for blood donor (BD) screening will depend on the HBV prevalence in the general and BD populations, the ratio of first-time (FTD) and repeat donors (RD), self-sufficiency in blood supply, and the country's economic resources.

According to the WHO report [2], several methods for HBV BD testing are available: a) HBsAg testing is the most common strategy globally, used by 56% (98/176) of WHO member states (Europe: 32.5% or 14/43); b) HBsAg and anti-HBc testing is used by 17.6% (31/176) of countries worldwide (Europe: 9.5% or 4/43) including 5 countries (3 of which are EU member states) that implemented selective anti-HBc tests; c) HBV DNA and HBsAg testing is used by 11.9% (21/176) of countries (Europe: 2.7% or 12/43); and d) HBV DNA, HBsAg and anti-HBc testing is used in 7.4% (12/176) of countries including 11.6% (5/43) of European countries. Additional 8 countries (including 5 EU member states) implemented the 3-test strategy with selective anti-HBc testing.

The implementation of molecular testing allowed the detection of occult hepatitis B virus infection (OBI) also characterized by the presence of detectable anti-HBc [3,4]. Anti-HBc testing proved to be more efficient than NAT when HBV DNA load corresponds to the lower limit of sensitivity of the NAT assay (<3 IU/mL HBV DNA). However, in the absence of molecular testing, qualitative anti-HBc testing does not discriminate between potentially infectious and non-infectious samples [5–8]. Anti-HBc was used recently as a supplementary test in the HBV DNA ID-NAT confirmation algorithm for initially reactive (IR) and non-repeated reactive (NRR) blood donors with HBV DNA load usually below 10 IU/mL and not confirmed by using quantitative highly sensitive tests or discriminatory ID-NAT tests.

Croatian Institute of Transfusion Medicine (CITM) is a national reference centre for transfusion medicine which collects more than 50% of all blood donations in Croatia every year (approx. 100,000 donations). The need to change BD HBV testing strategy in Croatia

Table 1
Blood donor characteristics in the three studies and residual risk calculation.

Characteristics of blood donations and donors	Year of study		
	2004	2013	2017
Total N blood donations	71,897	100,920	105,323
FTD %	10.1	6.1	6.4
RD %	89.9	93.9	93.6
Total N donors	39,011	49,003	50,445
FTD %	18.6	12.6	13.4
RD %	81.4	87.4	86.6
Female (F) donors %	20.4	21	22.4
HBV prevalence/10 ⁵ FTD	220	97	29.6
HBV incidence/10 ⁵ RD	12.6	28	9.2
Anti-HBc tested	7561	7318	5090
F donors %	17.4	13.1	16
M donors %	82.6	86.9	84
Residual risk (RR) ^a	68	88	12
HBV Look-back/Trace back	4/0	11/0	4/0

FTD; first time donors; RD; repeat donors.

^a Calculation of RR by European Medicines Agency 2016.

by introducing anti-HBc was assessed first in 2005 by using archive samples of BDs collected in 2004. This study aimed to establish the frequency of anti-HBc-only positive donors and their infectivity as HBV DNA testing was limited to this group of donors [9]. Two other studies investigating the efficiency of the anti-HBc marker in BD testing were carried out in 2013 and 2017. The objectives of the present study were to document anti-HBc prevalence in Croatian BDs over a 14-years period, analyse trends in anti-HBc prevalence according to age and gender and according to number of donations, to evaluate the potential infectivity of anti-HBc positive BDs by testing for HBV DNA presence. Data collected will provide elements to evaluate the impact of a possible introduction of anti-HBc testing of blood donors on HBV residual risk and potential loss of blood donors.

2. Material and methods

2.1. Blood samples

Archived residual serum samples from blood donations collected in October 2004 and in July–August 2013 and prospectively collected residual samples in May 2017 by CITM were included in the study. Samples were collected from consecutive donations and

Table 2
HBV tests used for blood donor testing in the three studies.

Test	Year of study		
	2004	2013	2017
Anti-HBc screening test	Hepatitis B Virus Core Antigen ORTHO HBc ELISA Test System	Architect Anti-HBc II (Abbott)	Prism HBcore (Abbott)
Anti-HBc alternative test 1	ETI-AB-COREK PLUS (DiaSorin)	Monolisa Anti-HBc PLUS (Bio-Rad)	Architect Anti-HBc II (Abbott)
Anti-HBc alternative test 2	Vitros aHBc (Ortho)	Vidas Anti-HBc Total II (BioMerieux)	Vidas Anti-HBc Total II (BioMerieux)
HBsAg screening test	Enzygnost HBsAg 5.0 EIA (Dade-Behring)	Prism HBsAg (Abbott)	Prism HBsAg (Abbott)
HBsAg alternative test	Murex HBsAg Version 3	Monolisa HBsAg ULTRA (Bio-Rad)	Monolisa HBsAg ULTRA (Bio-Rad)
Anti-HBs	Vitros (Ortho)	Architect (Abbott)	Architect (Abbott)
Anti-HBc IgM	Vitros (Ortho)	Architect (Abbott)	Architect (Abbott)
Anti-HBe	Vitros (Ortho)	Architect (Abbott)	Not done
HBsAg	Vitros (Ortho)	Architect (Abbott)	Not done
HBV DNA test	HBV MONITOR/Cobas Amplicor (Roche)	ID-NAT Procleix Ultrio Plus (HBV/HCV/HIV) (Grifols)	ID-NAT Procleix Ultrio Elite (HBV/HCV/HIV-1/HIV-2) (Grifols)
	HPS/HBV Cobas TaqMan48 (Roche)		

therefore were not stratified according to gender, age and the number of donations. BDs were classified in the following age groups: <20, 20–24, 25–29, 30–34, 35–39, 40–44, 45–49, 50–54, 55–59 and ≥60. Basic characteristics of the tested BD population in the 2004, 2013 and 2017 studies of the CITM are shown in Table 1. Serum samples were prepared for testing according to the standard operating procedures, and testing was done according to the manufacturer's instructions. The study was performed with the consent of the competent Ethical Committee pursuant to the Declaration of Helsinki.

2.2. Serological and molecular screening

Table 2 shows assays used for serological markers and HBV DNA testing according to the manufacturers' instructions.

2.3. Confirmation algorithms for anti-HBc reactivity

All donors tested anti-HBc positive in 2004, 2013 and 2017 were retested with the same anti-HBc assay and two alternative assays (Table 2). Repeatedly reactive (RR) samples confirmed with at least two anti-HBc assays were considered confirmed positive. All anti-HBc positive samples collected in 2004 and 2013 were tested for all HBV markers, whereas all anti-HBc positive samples from 2017 were tested only for anti-HBc IgM and anti-HBs. In all samples, HBsAg was also tested with an alternative test to exclude possible "s" mutations in the HBV genome. HBV DNA was tested in anti-HBc positive samples with a quantitative HBV DNA test (HBV Monitor/Cobas Amplicor, sensitivity of 54 IU/mL, and HPS/HBV Cobas TaqMan 48, sensitivity of 6 IU/mL) in 2004, and with ID-NAT assays in 2013 (Procleix Ultrio Plus test, 95% LOD for HBV 3.4 IU/mL) and 2017 (Procleix Ultrio Elite test, 95% LOD for HBV 4.3 IU/mL).

2.4. Statistical methods

The MedCalc v16.2.1 program was used for statistical analysis of results. A test of proportion (Chi² test) with the 0.05 significance level was used for establishing the difference in the number of subjects/BDs according to various categories, anti-HBc prevalence, presence of HBV DNA and positivity for other HBV markers. The Robert G. Newcombe's method was used for calculating 95% of confidence intervals.

3. Results

3.1. Anti-HBc prevalence

Table 3 shows the anti-HBc prevalence in blood donors in the years of study. A statistically significant decrease in anti-HBc prevalence was observed in 2013 as compared with 2004 (from 5.24% to 2.56%; $\chi^2 = 75.741$; $P < 0.001$), as well as in 2017 as compared with 2013 (from 2.56% to 1.32%; $\chi^2 = 22.97$; $P < 0.05$). The difference in anti-HBc prevalence in 2013 resulted from a 5.90% to 2.64% decreased prevalence in repeat donors (RD) ($\chi^2 = 87.670$; $P < 0.001$), whereas the decrease in anti-HBc prevalence in 2017 as compared with 2013 is a result of decreased prevalence in RDs from 2.64% to 1.38% ($\chi^2 = 4.04$; $P < 0.05$) and in first time donors (FTD) from 0.88% to 0.32% ($\chi^2 = 1.66$; $P < 0.05$).

Fig. 1 shows the anti-HBc prevalence reduction index in BDs, both overall and according to gender. Anti-HBc prevalence has reduced by 4 times in the 14-years period (4.11 in male donors and 2.09 in female donors). Interestingly enough, the 2013/2017 prevalence reduction index of 1.94 has almost reached the reduction index of 2.05 achieved in the 9-years period between 2004 and 2013. The greatest prevalence reduction was recorded in age groups 25–40 (10–18 times).

3.2. Anti-HBc prevalence according to donors' age and gender

The greatest anti-HBc prevalence reduction in male BDs in 2013 was registered in the age groups 50–60, whereas a statistically significant reduction was registered in groups older than 30 years of age ($P < 0.05$). A statistically significant prevalence reduction ($P < 0.05$) in 2017 compared with 2013 was observed in all groups older than 20 years of age.

Anti-HBc prevalence reduction in female BDs in 2013 compared with 2004 was observed only in the age group 40–44 ($P = 0.03$), and the reduction is not statistically significant in 2017 as compared with 2013 ($\chi^2 = 1.24$; $P = 0.265$), except in the age groups of 25–34, 40–44 and 50–59 years ($P < 0.05$).

3.3. Anti-HBc prevalence in FTD and RD

Anti-HBc prevalence in the population of FTDs in 2013 (0.88%) as compared with 2004 (1.37%), as well as the prevalence in 2013 as compared with 2017 (0.32%) does not indicate a statistically significant difference ($\chi^2 = 0.493$; $P = 0.492$)/($\chi^2 = 0.833$; $P = 0.361$). A significant anti-HBc prevalence reduction in the population of RDs was registered in 2013 as compared with 2004, in all age groups ($\chi^2 = 88.457$; $P < 0.01$) with the exception of the age group 20–24 ($\chi^2 = 1.217$, $P = 0.27$). A reduction in prevalence in 2017 as compared with 2013 was registered in all age groups ($\chi^2 = 243.74$; $P < 0.05$).

3.4. Anti-HBc-only prevalence

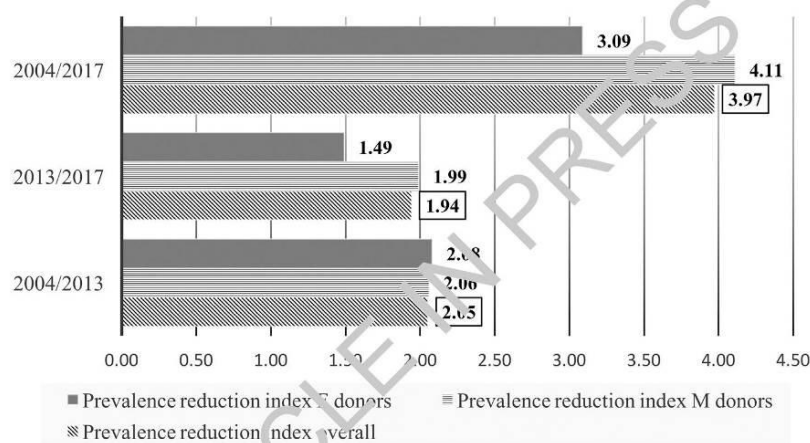
Anti-HBc-only prevalence in donors tested in 2004 was 0.62%, whereas in 2013 it was 0.25%, which showed a statistically significant difference ($\chi^2 = 11.65$, $P < 0.01$). Anti-HBc-only prevalence in donors tested in 2017 was 0.21%, implying a continuous decline

Table 3

Anti-HBc prevalence in blood donors in the years of study.

Anti-HBc prevalence % (95%CI) in the different groups of tested donors							
Year	Anti-HBc Anti-HBc-only	FTD		RD		F	M
2004	5.24 (4.76–5.77)	1.37 (0.83–2.25)		5.90 (5.35–6.50)			
	0.62 (0.47–0.82)	F 1.43 (0.61–3.30)	M 1.34 (0.73–2.45)	F 5.72 (4.42–7.37)	M 5.93 (5.34–6.59)	4.57 (3.57–5.84)	5.38 (4.85–5.97)
2013	2.56 (2.22–2.95)	0.88 (0.30–2.56)		2.64 (2.29–3.04)			
	0.25 (0.16–0.39)	F 0.0 (0.00–2.56)	M 1.55 (0.53–4.45)	F 2.59 (1.70–3.93)	M 2.64 (2.27–3.07)	2.20 (1.44–3.34)	2.61 (2.05–3.03)
2017	1.32 (1.04–1.67)	0.32 (0.06–1.80)		1.38 (1.09–1.75)			
	0.21 (0.12–0.39)	F 0.0 (0.00–3.15)	M 0.52 (0.09–2.89)	F 1.59 (0.89–2.82)	M 1.35 (1.04–1.75)	1.48 (0.85–2.57)	1.31 (1.01–1.70)

FTD: first time donors; RD: repeat donors; F: female donors; M: male donors.

**Fig. 1.** Anti-HBc prevalence reduction index in BDs, both overall and according to gender. F: female donors; M: male donors.**Table 4**

Results of other serological and molecular tests conducted on samples of anti-HBc tested BDs.

Test	Year of testing								
	2004			2013			2017		
	n tested	n positive	%	n tested	n positive	%	n tested	n positive	%
HBsAg routine and alternative test	7561	0	0	7318	0	0	5090	0	0
Anti-HBc	7561	396	5.24	7318	187	2.56	5090	67	1.32
Anti-HBc IgM	396	1(gz ^a)	0.25	187	0	0	67	0	0
Anti-HBs	396	319	80.56	185	162	87.57	67	55	82.09
Anti-HBe	396	147	37.12	187	62	33.16	0	nt ^b	–
HBsAg	396	0	0	187	0	0	0	nt ^b	–
HBV DNA	47	0	0	7318	0	0	5090	0	0

^a Grey-zone.^b Not tested.

trend; however, it is not significantly different as compared with 2013 ($\chi^2 = 0.206$, $P < 0.650$). Shares of anti-HBc-only positives among anti-HBc positives amounted to 11.8%, 9.6% and 16.4%, and the differences are not statistically significant ($\chi^2 = 0.46$, $P = 0.497$, $\chi^2 = 2.25$, $P = 0.134$). Statistically significant difference was found in the frequency of anti-HBc-only positives among anti-HBc positives in blood donors younger than 30 years, resulting in a significant prevalence reduction (23% in 2004/0% in 2013 – $\chi^2 = 50.88$, $P < 0.001$, and 0% in 2017 – $\chi^2 = 19.14$, $P < 0.001$).

3.5. Presence of other HBV markers

Table 4 shows test results of other HBV markers and HBV DNA. HBsAg was not confirmed in groups tested with two different HBsAg tests. Testing results have identified almost the same frequency of anti-HBs (80.56% and 87.57%) and anti-HBe (37.12% and 33.16%) positives among anti-HBc positive BD in 2004 and 2013 ($\chi^2 = 3.12$; $P = 0.077$) ($\chi^2 = 0.29$; $P = 0.587$). No statistically significant difference was observed in anti-HBs positive rates among

Please cite this article in press as: Miletić M, et al. Anti-HBc prevalence among Croatian blood donors in a 14-year period (2004–2017): Assessment of trends, risks and need for implementing routine testing. Transfusion Clinique et Biologique (2019), <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2019.05.001>

anti-HBc positive BDs from 2013 (87.57%) and 2017 (82.09%) ($\chi^2 = 1.03$; $P = 0.310$). Anti-HBs titer greater than 100 IU/L was registered in 54.1%, 55.1% and 52.3% of anti-HBc positives in the three groups with a statistically significant difference for all three years ($P < 0.0001$). Anti-HBs titer greater than 200 IU/L was registered in 47.5%, 43.2% and 40.4% of anti-HBc positive from 2004, 2013 and 2017 (statistically significant difference; $P < 0.0001$).

3.6. HBV DNA tests in BD samples tested for anti-HBc

HBV DNA was tested in 47 anti-HBc-only positive BDs from 2004 and all samples tested negative. Similarly, no viral DNA was detected by ID-NAT in 7,318 and 5,090 BDs from 2013 and 2017, respectively (Table 4).

4. Discussion

The results showed a significant reduction of anti-HBc prevalence from 5.24% to 1.32% over the 14-years period, mostly as a result of reduced prevalence in repeat blood donors (5.90% vs. 1.38%). The reduction in anti-HBc prevalence between 2004 and 2013 was not associated with gender (reduction index: repeat female BDs (F RDs)/reduction index: repeat male BD (M RDs) = 2.21/2.24), whereas prevalence reduction in male repeat donors was greater in 2017 compared to 2013 (M RDs/F RDs reduction index = 1.96/1.64). The greatest anti-HBc prevalence reduction in male repeat donors was observed in the 25–40 age group, and in female donors in the 40–49 age group. Possible general factors responsible for this anti-HBc prevalence reduction, apart from the RD's age shift, may be related to prevalence reduction in the general population due to the efficiency of preventive measures such as mandatory testing of pregnant women, universal vaccinations, safety levels in health-care and paramedic institutions, as well as of transfusion services, based on selection and testing of BDs, supported by national IT system and unique BD's database and centralised confirmatory testing. The important specific factor for reducing anti-HBc yield is certainly implementation of ID-NAT BD's testing in Croatia in 2013. Therefore, if the prevalence of anti-HBc in 2017 (1.32%) is corrected for OBI BDs in CTM (total $N = 27$, 2013 till 2017), anti-HBc prevalence would be 1.35%.

Anti-HBc prevalence decrease in FTD (1.27% in 2004, 0.88% in 2013, and 0.32% in 2017) was not significant. Blood donors from 2004 were only sporadically vaccinated against HBV whereas the rate of vaccinated donors increased to 10.4% in 2013 and 27.3% in 2017 (donors younger than 25 and 30 years of age, respectively). Anti-HBc prevalence in donors younger than 25 years of age was 0.32% in 2013 (FTD 0%, RD 0.37%) and 0% in 2017 (FTD 0%, RD 0%). Since the difference in anti-HBc prevalence in 2004/2013 and 2013/2017 among FTD is not statistically significant, it is reasonable to assume that exposure to HBV is continuously low in this age group. Croatia registers relatively few FTDs (approx. 10%), and they are recruited in younger age groups. Hence, 81% of FTDs tested for anti-HBc were younger than 29 in 2017, which would imply that they had received a mandatory vaccination against Hepatitis B virus.

Serological HBV profiles of anti-HBc positives did not change significantly over the period studied. The rate of anti-HBc-only among the anti-HBc positives was 11.8% in 2004, 9.6% in 2013 and 16.4% in 2017. Similar prevalence were reported in studies conducted in England (11.8%) [10] and Italy among FTD (10.4%) [11]. However, a statistically significant difference was found in the frequency of anti-HBc-only among the anti-HBc positives in blood donors younger than 30 years, mainly related to a general reduction of HBV prevalence in our donor population.

Anti-HBs positive rates among anti-HBc positive BDs were very similar during all three periods (80.56% in 2004, 87.57% in 2013 and 82.09% in 2017). The rates of BDs who were anti-HBs negative or having anti-HBs titer less than 100 IU/L (45.9% in 2004, 44.9% in 2013 and 47.7% in 2017) or less than 200 IU/L (52.5%, 56.8% and 59.6%, respectively) were very stable over the whole period studied.

In 2004, the rate of anti-HBe positives among anti-HBc positives was 37.1% and 33.2% in 2013 indicating stable serological profile in HBsAg-negative and anti-HBc positive BDs. There was only one registered case of an anti-HBc IgM grey-zone result in 2004 and no case of HBe antigenemia.

HBV DNA or OBI was not detected in 2004 among 47 anti-HBc-only positives tested with an assay sensitivity of 6 and 54 IU/mL. The use of highly sensitive ID-NAT assays also failed to detect HBV DNA in 12,408 BDs in 2013 and 2017.

A simulation of introducing anti-HBc test in testing of BD in Croatia, based on anti-HBc prevalence in 2017 (1.32%; 95%CI 1.04%–1.67%) and 95,000 blood donors per year (18,000 FTDs and 77,000 RDs) and the annual average number of donations by repeat donors of 2.1 would lead to the loss of: a) 988–1587 blood donors in case of universal testing with elimination of all anti-HBc positives, which would correspond to a loss of 1869–2999 blood donations a year, b) 472–758 blood donors in case of universal testing with elimination of all anti-HBs positives with a titer of less than 100 IU/L, which would correspond to a loss of 893–1434 blood donations a year, c) 569–947 blood donors in case of universal testing with elimination of all anti-HBs positives with a titer of less than 200 IU/L, which would correspond to a loss of 1115–1790 blood donations a year, and d) 11–326 blood donors in case of testing of first-time blood donors only.

However, the present study did not evidence the presence of OBI infection among anti-HBc positives. In the first year of testing blood donors in Croatia with ID-NAT tests, the frequency of OBI was reported at 1:7031, whereas after the 3-years period, it was reported at 1:10,900 donations [12], followed by a further significant decrease: 1:98,494 in 2016, 1:28,495 in 2017 and 1:195,815 in 2018. The analysis of 23 OBI donor archive samples showed the consistency of anti-HBc positive results (100%), as opposed to ID-NAT (63%) and ID-NAT reproducibility (50%), as expected for samples with a low HBV DNA viral load [13]. Those data support the importance of anti-HBc testing in identifying OBI donors.

Recently, anti-HBc prevalence of <2% [14] has been proposed as a possible limit at which HBV safety is increased without critical impact on donor deferral. High anti-HBc prevalence does not always imply high OBI frequency. Namely, the rate of HBV DNA positives among anti-HBc positives varies in the range of 0–100% [15]. Another important factor is the contribution of anti-HBc tests to the reduction of HBV blood transmission risk, that can best be assessed by analysing results of look-back studies conducted in OBI donors and blood product recipients. Transmission rates vary and depend mostly on the recipient's availability for monitoring the infection within an adequate time-frame. Look-back procedures conducted for OBI in the Netherlands, Japan and Australia have established low HBV transmission rates from OBI donors of 5%, 3.5% and 0.2–3.2% [16–18]. A much higher transmission rate (28%) associated with plasma viral load in blood components and presence of anti-HBs in both donors and recipients was reported in a multi-centric European look-back study that included data from Croatia [19]. Differences in OBI frequency are attributed to genomic and epigenomic factors affecting DNA, viral and host's hepatocytes. Robust evidence for genotype-dependent frequency of OBI are still missing but this might be another important factor in assessing the usefulness of anti-HBc testing in a given geographical area [20].

5. Conclusion

During the period 2004–2017, a significant 4-times decrease in anti-HBc prevalence in Croatian blood donors from 5.24% to 1.32% was observed. No OBI infection among anti-HBc positive BDs was detected in this study. Due to the high consistency of anti-HBc in Croatian OBI BDs, a strategy of universal testing of blood donors for this marker in addition to existing HBsAg and ID-NAT screening in Croatia would represent an additional measure to prevent HBV transmission by blood and blood components. By deferring all anti-HBc positive donors, at least 1.32% of blood donors should be substituted. Testing of FTDs only would be a less efficient method of risk reduction because: a) in Croatia OBI donors have been identified only in RDs (age group 43–67, M 58 years), b) FTDs mostly consist of young people who have already been vaccinated against HBV virus, and c) results from the most recent study have identified no anti-HBc positives among donors younger than 29 years of age. The decision to include mandatory anti-HBc testing in the existing BD screening strategy needs to be supported by further cost-benefit analyses.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no competing interest.

Acknowledgement

We would like to thank Ortho Clinical Diagnostic (USA), Abbott (USA), and Bio-Rad Laboratories (USA), for providing the anti-HBc tests for the study. Dr D Candotti, *Institut National de la Transfusion Sanguine*, Paris, France, (is also acknowledged for helping with the French version of the abstract) and Dr A Vockel, Abbott Scientific Affairs, Wiesbaden, Germany, are acknowledged for valuable suggestions.

References

- [1] Candotti D, Allain JP. Transfusion-transmitted hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2009;51:798–809.
- [2] WHO. 2017; Global Status Report on Blood Safety and Availability 2016. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254987/1/9789241565431-eng.pdf>.
- [3] Raimondo G, Allain JP, Brunetto MR, Buendia M, Chen Z-S, Colombo M, et al. Statements from Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2008;49:652–7.
- [4] Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997;337:1733–45.
- [5] Allain JP. Occult Hepatitis B virus infection; implication in transfusion. *Vox Sang* 2004;86:83–91.
- [6] Stramer SL, Zou S, Notari EP, Foster GA, Krysztof DE, Musavi F, et al. Blood donation screening for hepatitis B virus markers in the era of nucleic acid testing: are all tests of value? *Transfusion* 2012;52:440–6.
- [7] Lelie N, Bruhn R, Busch M, Vermeulen M, Tsoi W-C, Kleinman S, et al. 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;57:24–35.
- [8] O'Brian SF, Fearon MA, Yi Q-L, Fan W, Scalia V, Muntz IR, et al. Hepatitis virus DNA-positive, Hepatitis B surface antigen-negative blood donations intercepted by anti-hepatitis B core antigen testing: the Canadian Blood service experience. *Transfusion* 2007;47:1809–15.
- [9] Mihaljević I, Lovrić M, Babić I, Dražić V, Balija M, Jukić I. Incidence of Anti-HBc in the population of Croatian Blood Donors. The AABB 2007 Annual Meeting & TXPO, Anaheim, October 20–23, 2007, California. *Transfusion* 2007;47:99A.
- [10] Allain JP. Global epidemiology of occult HBV infection. *Ann Blood* 2017;2:7.
- [11] Romano L, Velati C, Cambiè G, Fomiatti L, Galli C, Zanetti AR, et al. Hepatitis B virus infection among first-time blood donors in Italy: prevalence and correlates between serological patterns and occult infection. *Blood Transfus* 2013;11:281–8.
- [12] Safic Stanic H, Babić I, Maslovic M, Dogic V, Bingulac-Popovic J, Miletić M, et al. Three-year experience in NAT screening of blood donors for transfusion transmitted viruses in Croatia. *Transf Med Hemother* 2017;44:415–20.
- [13] Mihaljević I, Ivanković E, Drežnjancević D, Jaklin G, Lukežić N, Babić I, et al. HBV-OBI look-back procedure: and control? *Vox Sang* 2014;107:41–2.
- [14] ISBT TTD Working Party. “HBV safety” study-group. Characterization of “occult” HBV yield cases identified by NAT (ID or small pool) or anti-HBc screening. Available from: http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/files-2015/ttid/Virology/HBV%20Safety/HBV%20Safety%20presentations/occult%20HBV%20yield%20cases%20by%20ID-NAT%20or%20anti-HBc%20screening%20HBV%20Safety%20protocol%20TTD.pdf.
- [15] Makroo N, Chowdhry M, Bhatia A, Arora B, Rosamma NL. Hepatitis B core antibody testing in Indian blood donors: a double-edged sword! *Asian J Transf Sci* 2012;6:10–3.
- [16] Lieshout-Krikke RW, Molenaar-de Backer MW, Swieten P, Zaaier HL. Surface antigen-negative hepatitis B virus infection in Dutch blood donors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33:69–77.
- [17] Satake M, Taira R, Yugi H, Hino S, Kanemitsu K, Ikeda H, et al. Infectivity of blood components with low hepatitis B virus DNA levels identified in a lookback program. *Transfusion* 2007;47:1197–205.
- [18] Seed CR, Maloney R, Kiely P, Bell B, Keller AJ, Pink J. Blood service medical services lookback team. Infectivity of blood components from donors with occult hepatitis B infection – results from an Australian lookback programme. *Vox Sang* 2015;108:113–22.
- [19] Allain JP, Mihaljević I, Gonzalez-Fraile MI, Gubbe K, Holm-Harritshøj L, Garcia JM, et al. Infectivity of blood products from donors with occult hepatitis B virus infection. *Transfusion* 2013;53:1405–15.
- [20] Zhu H-L, Li X, Li J, Zhang Z-H. Genetic variation of occult hepatitis B virus infection. *World Gastroenterol* 2016;22:3531–46.

Three-Year Experience in NAT Screening of Blood Donors for Transfusion Transmitted Viruses in Croatia

Hana Safic Stanic^a Ivana Babic^a Margareta Maslovic^a Vesna Dogic^a
Jasna Bingulac-Popovic^a Manuela Miletic^a Nina Jurakovic-Loncar^a Tomislav Vuk^a
Maja Strauss-Patko^a Irena Jukic^{a,b}

^aCroatian Institute of Transfusion Medicine (CITM), Zagreb, Croatia;

^bJosip Juraj Strossmayer University of Osijek, Osijek, Croatia

Keywords

Blood donor's screening · NAT testing ·
Transfusion-transmissible infections

Summary

Background: Croatia implemented individual donation (ID)-NAT testing of blood donors in 2013 for three viruses HBV, HCV, and HIV-1 as a mandatory test for all blood donors. This study assessed the impact of NAT screening 3 years after its implementation. **Methods:** A total of 545,463 donations were collected and screened for HBV, HCV, and HIV-1 using the Procleix Ultrio Plus Assay. All initially reactive (IR) NAT samples were re-tested in triplicate and, if repeatedly reactive (RR), NAT discriminatory assay (dNAT) was performed. ID-NAT positive donations were confirmed by RT-PCR on the COBAS AmpliPrep/TaqMan platform. **Results:** Out of 545,463 samples tested, 108 (0.02%) were RR in NAT. There were 82 (75.9%) HBV reactive, 16 (14.8%) HCV reactive, and 10 (9.3%) HIV-1 reactive samples. 51 (47.2%) samples were ID-NAT positive only. Out of these 51 NAT yield cases, 1 window period HIV-1 and 50 occult HBV infections (OBI) were determined. There were only two potential HBV DNA transmissions from OBI donors. **Conclusion:** The implementation of NAT screening for three viruses has improved blood safety in Croatia. During the 3-year period, 1 window period HIV-1 and a number of occult HBV donations were identified.

© 2017 S. Karger GmbH, Freiburg

Introduction

The safety of blood and blood components continues to raise debate all over the world. In the past few decades, many measures have been introduced in order to reduce the risk of transmission of blood-borne viruses [1]. In the early 1990s, nucleic acid amplification testing (NAT) expanded rapidly, and blood centers started testing blood units using molecular assays. Before becoming mandatory, it was used on a voluntary basis. Germany was the first country to introduce NAT screening in 1997 on a routine basis, with negative NAT results required prior to the release of blood components. Initially, the methodology included 'in-house' developed semi-automated testing for HBV, HCV, and HIV-1, but NAT screening for HCV and HIV-1 became mandatory in 1999 and 2004, respectively [2, 3]. Several other countries followed Germany and introduced NAT screening primarily for HCV and then for HIV-1 genomes (Austria, Canada, Ireland, Japan, The Netherlands, Spain, Switzerland, the UK, and the USA). Japan and Austria were the first countries that implemented mandatory HBV NAT testing in 1999, followed by global implementation of HBV NAT screening after 2004. The low expected yield and clinical value of interdiction of seronegative HBV infections were the main reason for delayed implementation of HBV NAT [2, 4]. Over years, NAT testing became mandatory in western countries and began to be performed with commercial CE-marked NAT systems in multiplex format, detecting all three viral genomes on automated testing platforms. At the beginning, the majority of countries started NAT testing in minipools (MP-NAT) of 96–16 pooled samples, however, there was progression towards smaller pools of 6 to individual donations (ID) in order to enhance testing sensitivity [5]. Compared to the existing HBsAg assays, MP-NAT reduced the window period (WP) of

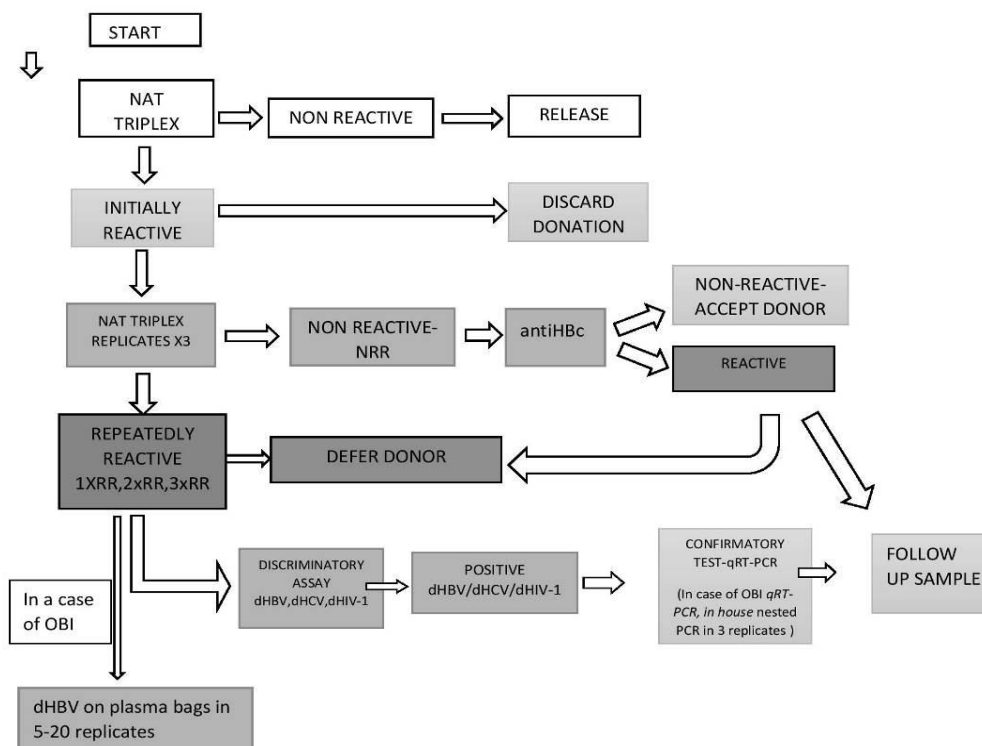


Fig. 1. NAT testing algorithm at the CITM.

HBV infection by 9–11 days, and ID-NAT reduced the WP by 25–36 days, which indicates that ID-NAT would have a higher yield than MP-NAT in case of HBV infection. The difference was due to the pooling dilution effect that diminishes assay sensitivity [6–11]. However, MP-NAT strategies are still preferred due to the cost-benefit analysis in some western countries where the prevalence of the tested virus is low. Even though the risk of transfusion-transmitted infections (TTIs) had been reduced significantly by sensitive serologic blood screening and introduction of stringent donor selection criteria in Croatia, the risk of TTIs still persisted. The greatest challenge for transfusion medicine is the risk of HBV transmission due to persistent occult HBV infection (OBI) with very low HBV DNA viremia in which HBsAg is not detectable. For this reason, and based on the Croatian epidemiological situation and analytical/clinical performance data of manufacturers for NAT testing of blood donors, the national blood transfusion committee of Croatia decided to implement mandatory ID-NAT testing in March 2013 as a routine blood screening program, in concordance with serologic screening. The project was implemented as a part of restructuring and centralization of the Croatian blood service. The aim of this study was to evaluate the results of ID-NAT testing during a 3-year period and to analyze the NAT yield rate of HBV, HCV, and HIV-1 screening in Croatia.

Material and Methods

Collection of Blood Donor Samples and Delivering to the Croatian Institute of Transfusion Medicine

All blood donations collected at the blood centers and mobile units across Croatia in the period from March 1, 2013 until March 1, 2016 were donated by voluntary non-remunerated blood donors. Serology and ID-NAT tests were performed concurrently using two different samples. Testing was performed at the Croatian Institute of Transfusion Medicine (CITM), Department of Molecular Diagnosis in Zagreb, the only NAT testing site in Croatia using the Procleix Ultrio Plus Assay on three Procleix Tigris System instruments (Grifols, Spain). Test results were then distributed through the e-Delphyn, national transfusion IT system that interconnects all 8 blood centers (Split, Dubrovnik, Osijek, Rijeka, Pula, Varaždin, Zadar, and Zagreb) in Croatia.

ID-NAT Testing Methodology, Algorithm at the Croatian Institute of Transfusion Medicine and Residual Risk Calculation

The Procleix Ultrio Plus Assay is a multiplex NAT test for simultaneous detection of HBV DNA, HCV RNA, and HIV-1 RNA. The 95% probability of detecting each of the three viruses was similar between the Procleix Ultrio Plus assay and the discriminatory assay, i.e. 21.2 versus 18.9 IU/ml, 5.4 versus 4.4 IU/ml and 3.4 versus 4.1 IU/ml for HIV-1, HCV and HBV, respectively. The algorithm of ID-NAT testing at the CITM is presented in figure 1. We decided to implement anti-HBc testing (Architect; Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA) for each initially reactive (IR) repeatedly non-reactive (NRR) donation to improve the sensitivity of OBI detection in blood donors.

The follow-up testing included routine and confirmatory NAT and serologic testing – for HBV HBsAg tests (ELISA/CMIA and, if necessary ELFA), the quantitative HBsAg and neutralization test, all HBV markers; for HCV a combination of anti-HCV and HCV Ag/Ab (ELISA/ELFA), optionally HCV Ag,

imunoblot test (if needed 2); for HIV-1 a combination of 3 HIV Ag/Ab assays (ELFA/ELISA/CMIA) and anti-HIV, HIV-Ag and imunoblot test (if needed 2). Confirmatory testing and detection of viral load with an alternative NAT method was performed in the incriminating donation and in the follow-up sample with COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan RT-PCR tests, v 2.0, for HBV, HCV, and HIV-1, with detection limits of 20 IU/ml for HBV, 15 IU/ml for HCV, and 20 cp/ml for HIV1 RNA (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). In a case of OBI, discriminatory HBV assay was performed on plasma bags in 5–20 replicates, and 'in-house' nested PCR amplification of HBV pre-S and S gene was performed in 3 replicates. ID-NAT archive is stored at –25 °C for at least 2 years.

Residual risk for TTI based on ID-NAT was calculated according to proposed WHO guidelines [12].

Trace-Back and Look-Back Procedures

Donor-directed look-back (LB) procedures were initiated when confirmed viral infection in repeat donor was established. From our IT database we retrieved all data on the incriminating donations. In case of HBV, HCV and HIV-1 NAT and/or serology-positive units, we tested all recipients of the last negative donation. If the blood recipients deceased or were unreachable, then donors' archived samples were thawed and tested by ID-NAT for the presence of viral markers. In a case of confirmed OBI, we tested all available archived samples and then all reachable recipients of HBV-positive donations determined during LB procedure.

Results

A total of 545,463 donations were collected and tested for HBV, HCV, and HIV-1 during the 3-year period. The overall specificity was 99.95%, and the rate of invalid runs was around 2%. The results of NAT testing were delayed 31 times from optimal validation time (9.30 a.m. day 1) by not more than 10 h. Hardware failure on Tigris instruments or other problems in testing (28/31, 90%) was one of the main reasons for delay of the results. We found 322 (0.06%) ID-NAT IR samples: 214 (0.04%) were found to be false-positive, and 108 (0.02%) were ID-NAT repeatedly positive blood donations. All IR donations were discarded in order to avoid potentially low-level viremic units missed by repeat testing. There were 51 ID-NAT only positive donations (50 HBV NAT and 1 HIV-1 NAT positive blood donors). NAT yield cases were predominantly HBV NAT reactive; they were later found to be anti-HBc positive, and determined as OBI infections. WP was determined for 1 HIV-1 NAT positive donation. The highest prevalence of reactive blood donor samples was recorded in the CITM (56/108), as it the most important blood center that collects and distributes approximately 56% of total blood supply in the country. Table 1 shows the number of interdicted infectious blood units according to serology and ID-NAT testing. Among 108 RR ID-NAT donations, 16 (14.8%) blood donations were HCV-NAT and anti-HCV reactive, 9 (8.3%) donations were HIV-1 NAT and HIV Ag/At reactive, 1 donation was HIV-1 NAT only reactive (0.9%), and 82 (76%) blood donations were HBV-NAT reactive. All ID-NAT yield cases for HBV were OBIs (50/82), defined by the presence of HBV DNA in the absence of HBsAg. Viral loads in individual donations ranged from $<2.00 \times 10^1$ to $>1.7 \times 10^8$ IU/ml for HBV, from 3.64×10^3 to 7.89×10^6 IU/ml for HCV, and from 1.82×10^2 to 9.93×10^4 C/ml for HIV-1. In all cases of NAT positive / serol-

Table 1. Number of repeatedly reactive blood units interdicted during 3 years in Croatian blood supply according to ID-NAT and serology

Testing	Number of repeated reactive blood units		
	HBV	HCV	HIV-1
NAT and serology	32	16	9
Serology	1	6	0
ID-NAT only	50	0	1
Total	83	22	10

ogy positive samples as well as in the WP HIV 1 infection, follow-up samples were also positive when tested with an alternative NAT method.

We estimated the risk of viral TTI in blood donations collected in Croatia from 2013 to 2016. Calculation of TTI residual risks included 481,389 blood donations from repeat donors along with 45 HBV-DNA, 1 HCV-RNA and 6 HIV-1 RNA positive donations from repeat donors. The established interdonation interval was 156 days. The residual risk of HBV TTI was 1: 36,900 (with adjustment for transient HBsAg), that of HIV-1 TTI 1:1,567,398, and that of HCV TTI 1:15,015,015.

OBI among Tested Donations

The prevalence of OBI was much higher among repeat donors 45/50 (90%). The majority of OBI carriers were males (43/50, 86%), which is in accordance with sex distribution of the general blood donor population, and they were generally older than the total donor population (median age 58 years). ID-NAT testing for OBI cases showed reproducibility of 59% when repeat testing in triplicate was performed. Overall, 29 donor samples had 2–3 positive replicates and 21 samples only 1 replicate positive, when tested in triplicate. This was explained by determining blood donor samples with a very low HBV-DNA titer. Only 38/50 blood donors with OBI had positive ID-NAT test in follow-up sample, and 9/50 had negative ID-NAT result, while 3 samples are still in process. There were considerable fluctuations in donor viral load over time. Only 3 donors had a measurable HBV-DNA titer (ca. 10×10^2 IU/ml) in their follow-up sample. In 20 follow-up confirmatory samples, the titer was reactive at <20 IU/ml HBV DNA, whereas in another 20 blood donors we were not able to detect HBV DNA in follow-up samples, which could be explained by extremely low (1–5 IU/ml) and fluctuating HBV DNA titers close to the method detection level. Four follow-up samples did not have enough material for HBV DNA confirmation, and 3 are still in process. Almost all blood donors with OBI were anti-HBc positive (98%) and in some cases (50%) anti-HBs and/or anti-HBe positive. The levels of anti-HBs ranged between 9 and 784 IU/l. Finally, during the 2013–2016 period, 50 HBV positive donations were discarded according to NAT only, yielding an incidence of OBI infection of 1 per 10,900 donations.

Prevention of HIV-1 Infection Transmission in the WP

One ID-NAT only positive donation given by a 54-year-old repeat donor was determined by routine ID-NAT testing and

identified as a WP HIV-1 infection. HIV-1 RNA quantitative assay confirmed the presence of the virus in a load of less than 2.00×10^1 C/ml. Routine serologic screening test for HIV Ag/Ab (Abbott Prism HIV Ag/Ab Combo, Abbott Diagnostics) was negative as well as all confirmatory tests including alternative HIV Ag/Ab, anti-HIV-1/2, HIV-1 p24 Ag and anti-HIV-1/2 immunoblot assay. The follow-up blood sample obtained 6 days after the incriminating donation showed an increasing titer of HIV-1 (3.52×10^4 C/ml), but serologic screening HIV Ag/Ab test was still negative. However, the confirmatory tests, the alternative HIV Ag/Ab assay and HIV-1 p24 were weakly positive, but anti-HIV-1/2 and anti-HIV-1/2 immunoblot test were still negative. The HIV-1 NAT yield demonstrated the first case of HIV-1 RNA in the WP and thus successfully prevented possible TTI with HIV-1 to one or more recipients.

LB Procedures after Confirmed Blood Donor Infection in CITM

In a 3-year period, the CITM conducted 47 LB procedures, most of which affected HBV OBI cases (76,6%). For the OBI LB procedures, 101 samples of the serologic archive and 30 samples of the NAT archive were tested of which 34 (33.7%) and 6 (20%), respectively, were found to be HBV DNA positive. There were only 2 probable transmissions of HBV from 2 OBI donors. One recipient was tested positive for HBV DNA directly after blood transfusion; 8 months after the incriminating blood transfusion he showed serologic markers of resolved HBV infection and negative HBV DNA. The other recipient had anti-HBc and anti-HBe positive markers without HBV DNA. It is not known whether or not the recipients had these markers before the incriminating transfusion. Interpreting the LB data over 3 years, we noticed the decreasing trend in OBI cases among repeat donors, and we are expecting a further decrease due to the very sensitive tests and strict algorithm. There were no confirmed HCV or HIV-1 TTI cases in our recipients.

Discussion

In recent years, transfusion safety has undergone significant improvement, and blood transfusion therapy has never been as safe as it is nowadays. This enormous gain towards blood safety has been achieved through many factors including more stringent donor selection criteria, improved sensitivity of the screening tests, improvements in preparation and quality control of blood components, and inclusion of NAT testing in the routine screening program [13]. Recent studies performed in other countries have shown that the estimated risk of TTI via blood products is very low [14–16]. The main advantages of NAT screening are interdiction of WP infections and identification of OBI carrier status, offering blood centers a much higher sensitivity for detecting blood-borne infections [17]. Reports from developed countries showed a limited value of NAT screening in improving blood safety [17, 18]. In contrast to this, the prevalence of TTIs in resource-limited countries is always high, and these countries are likely to yield a significant

number of WP donations; thus NAT testing is expected to be more cost-effective in these countries. These resource-limited settings mainly include countries in Africa, Asia, and Latin America with a high prevalence of blood-borne virus infections.

NAT yields have been determined for several countries in the last decade. Italy has reported a NAT yield rate for HBV, HCV and HIV-1 of 57.8 per million, 2.5 per million and 1.8 per million, respectively [14]. Slovenia has reported similar data, with 63.3 per million for HBV, 4.27 per million for HCV and 0.0 per million for HIV-1 [19]. Compared to the neighboring countries, Croatia has reported higher NAT yields of 91.7 per million donations for HBV and 1.8 per million donations for HIV-1, whereas the HCV NAT yield was lower (0.00 per million). Yield rates observed for HIV-1 NAT are similar to those in France and Germany (0.3 per million donations). Higher rates have been reported from Greece and Spain (2–4 per million donations). For HCV, the rates of NAT are lower in northern countries (Switzerland 0.45 per million donations and Ireland 0.00 per million donations) than in Mediterranean countries (Spain 2.15 per million and Greece 5.97 per million). Countries with low HBV endemism, such as Germany, Switzerland, New Zealand, the US and Canada, reported HBV NAT yields of up to 1:730,000 [20–24], whereas countries with moderate endemism such as Poland and some Mediterranean countries reported figures up to 1:51,987 [25–27]. The HBV NAT incidence rate of 1 per 10,900 donations in Croatia is comparable to the HBV incidence rate of 1:15,600 HBV positive donations in Slovenia. Other neighboring countries have not yet implemented NAT screening testing of blood donors. In countries with high endemism, such as Ghana, Hong Kong, India and South Africa, the reported NAT HBV yield ranged from 1:186 to 1:5,200 [28–32].

Croatia has a population of 4.3 million and collects about 195,000 blood donations per year. It belongs to countries with low prevalence of HBV, HCV, and HIV-1 infections in the general population, as well as in blood donors. The introduction of mandatory hepatitis B vaccination of schoolchildren in 1999 and later of newborns in 2007 resulted in a decrease in the incidence of hepatitis B, and a further decline is expected. The incidence of hepatitis C in Croatia is decreasing as well; less than 2% of the population are anti-HCV positive. In spite of a relatively favorable epidemiological status, hepatitis B and C still pose a significant public health burden. The annual incidence of HIV-1 infections ranges from 12 per million to 19 per million in the general population. Thus, Croatia is among the countries with a low HIV-1 prevalence (the average prevalence in the EU/EEA in 2012 is 58 per million), with the two most-at-risk groups of men having sex with men and commercial sex workers [33]. However, over the last years an albeit very modest increase in the HIV-1 incidence has been detected, mostly among men in the general population as well as in the population of blood donors. Implementation of centralized NAT testing in 2013 and standardized quality of testing and production of blood components have improved blood safety by reducing the risk of transfusing infectious units to blood recipients to entering 2 per million in case of HIV-1 and to 91.67 per million in case of HBV. During the study period, we did not find any WP donation for

HCV infection (0.0 per million donations). Considering all HBV DNA positive donors found in Croatia, the risk of a potentially infectious donation was much higher for HBV than for HCV or HIV. OBIs were considerably more frequently detected among older repeat blood donors. Almost all (98%) Croatian OBI donors were anti-HBc positive, and approximately half of them also carry anti-HBe and anti-HBs, with 40% of them having titers of more than 10 IU/l, potentially able to neutralize viral infectivity. Similar data are described in other publications [26, 34] suggesting that OBIs occur largely in individuals that have recovered from the infection but were unable to develop a totally effective immune control against HBV [4, 11]. The infectivity of HBV depends on many factors, e.g. viral dose (number of HBV genome copies/ml), blood component which was transfused (fresh frozen plasma and platelet concentrates suspended in plasma are considered more infectious than red cell concentrates), the presence of anti-HBs, and the recipient immune status [35]. The neutralizing capacity of low anti-HBs may be inefficient when overcome by high viral load. Satake et al. [36] reported that blood components collected from OBI donors with low levels of anti-HBc were more than 10 times less infectious than units collected from donors in the WP of infection. Although the OBI infectivity potential seems to be low, especially if anti-HBs is present, rare transmissions causing acute liver failure have been reported in immunosuppressed patients [37]. The OBIs are also characterized by very low HBV DNA plasma load, mostly below 1,000 IU/ml and often below 100–10 IU/ml. At low HBV viral load, pool testing is likely to be ineffective, and most of our OBI cases would be missed on MP-NAT testing. Even the ID-NAT testing is sometimes ineffective to detect titers below 95% limit of detection of HBV-DNA in OBIs. Only testing in replicates enables higher sensitivity as demonstrated by our archived sample analysis. According to our LB data, we found no evidence of any case of TTI confirmed from OBI donors. Only two blood recipients had markers of the resolved HBV infection but it is hard to conclude on the causal relationship since we did not have any data on their status before the transfusion and the genome sequencing was not completed. The high residual risk for HBV TTI is predominantly influenced by higher number of OBIs detected in the repeat donor population after introduction of ID-NAT. On the other hand, the extremely low residual risk for HCV TTI could be explained by the

very short WP of HCV ID-NAT. During the first year of NAT implementation, the finding of OBI blood donors was relatively frequent, but with time their number decreased with deferral of occult carriers, and we are expecting a further decreasing trend. The prevalence of the other two viral markers was stable and oscillated around 0.0004 and 0.0002 for HCV and HIV-1, respectively.

Conclusion

The choice of centralized ID-NAT screening, the implementation of IT transfusion network for the whole country, and the cooperation among 8 blood centers has proved to be effective for improving blood transfusion safety without compromising optimal blood product supply and release on time. Completion of testing on time is of utmost importance for the transfusion service when considering the short shelf life of the some of the blood products. The number of HBV-infected donors interdicted during the study, along with the HIV-1 WP infection, justifies the implementation of ID-NAT testing for donor screening. There is no possibility to produce blood components with a zero risk of TTI due to the WP of infections and new emerging/reemerging threats, but NAT testing of blood donors and other measures such as vaccination against HBV are crucial for further reducing the risk of TTI towards zero. Additional improvements could be achieved by the implementation of NAT screening for HIV-2 virus in Croatia and by a more sensitive test for confirmatory testing for HBV DNA with an alternative NAT method in the follow-up samples.

Acknowledgements

We would like to thank all transfusion centers in Croatia for good cooperation in preparing the data for manuscript. Also we thank all technicians doing the NAT testing at the CITM for their excellent working skills.

Disclosure Statement

The authors declare no conflict of interests.

References

- World Health Assembly, 63: Viral Hepatitis – Report by the Secretariat 2010. <http://apps.who.int/iris/handle/10665/2383>. (last accessed April 19, 2017).
- Roth WK, Busch MP, Schuller A, et al: International survey on NAT testing of blood donations: expanding implementation and yield from 1999 to 2009. *Vox Sang* 2012;102:82–90.
- Coste J, Reesink HW, Engelfriet CP, et al: Implementation of donor screening for infectious agents transmitted by blood by nucleic acid technology: update to 2003. *Vox Sang* 2005;88:289–303.
- Biswas R, Tabor E, Hsia CC, Wright DJ, Laycock ME, Fiebig EW, Peddada L, Smith R, Schreiber GB, Epstein JS, Nemo GJ, Busch MP: Comparative sensitivity of HBV NATs and HBsAg assays for detection of acute HBV infection. *Transfusion* 2003;43:788–798.
- Candotti D, Allain JP: Transfusion transmitted hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2009;51:798–809.
- Kumar R, Gupta S, Kaur A, Gupta M: Individual donor nucleic acid testing for human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus and hepatitis B virus and its role in blood safety. *Asian J Transfus Sci* 2015;9:199–202.
- Allain JP: Occult hepatitis B virus infection: implications in transfusion. *Vox Sang* 2004;86:83–91.
- Chatterjee K, Coshic P, Borgohain M, Premchand, Thapliyal RM, Chakroborty S, Sunder S: Individual donor nucleic acid testing for blood safety against HIV-1 and hepatitis B and C viruses in a tertiary care hospital. *Natl Med J India* 2012;25:207–209.
- Seo DH, Whang DH, Song EY, Han KS: Occult hepatitis B virus infection and blood transfusion. *World J Hepatol* 2015;7:600–606.
- Makroo RN, Chowdhry M, Bhatia A, Antony M: Evaluation of the Procleix Ultrio Plus ID NAT assay for detection of HIV1, HBV and HCV in blood donors. *Asian J Transfus Sci* 2015;9:29–30.

- 11 Stramer SL, Wend U, Foster GA, Hollinger FB, Dodd RY, Allain JP, Gerlich W: Nucleic acid testing to detect HBV infection in blood donors. *N Engl J Med* 2011; 364:236–247.
- 12 World Health Organization: WHO Guidelines on Estimation of Residual Risk of HIV, HBV or HCV Infections via Cellular Blood Components and Plasma. October 2016. Expert Committee on Biological Standardization, Geneva, 17 to 21 October 2016. www.who.int/biologicals/expert_committee/Residual_Risk_Guidelines_final.pdf (last accessed April 19, 2017).
- 13 Laperche S: Blood safety and nucleic acid testing in Europe. *Euro Surveill* 2005;10:3–4.
- 14 Velati C, Romano L, Formiatti L, Baruffi L, Zanetti AR, SIMTI Research Group: Impact of nucleic acid testing for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus on the safety of blood supply in Italy: a 6-year survey. *Transfusion* 2008;48:2205–2213.
- 15 Niederhauser C, Schneider P, Fopp M, Ruefer A, Levy G: Incidence of viral markers and evaluation of the estimated risk in the Swiss blood donor population from 1996 to 2003. *Euro Surveill* 2005;10:518.
- 16 Pillonel J, Laperche S, Saura C, Desenclos JC, Couroucé AM, Transfusion-Transmissible Agents Working Group of the French Society of Blood Transfusion: Trends in residual risk of transfusion-transmitted viral infections in France between 1992 and 2000. *Transfusion* 2002;42:980–988.
- 17 El Ekiaby M, Lelie N, Allain JP: Nucleic acid testing (NAT) in high prevalence-low resource settings. *Biologicals* 2010;38:59–64.
- 18 Chigurupati P, Murthy KS: Automated nucleic acid amplification testing in blood banks: an additional layer of blood safety. *Asian J Transfus Sci* 2015;9:9–11.
- 19 Levicnik Stezinar S, Nogrsek P: Yield of NAT screening in Slovenia. *Zdrav Vestn* 2012;81:257–264.
- 20 Niederhauser C: Reducing the risk of hepatitis B virus transfusion-transmitted infection. *J Blood Med* 2011;2: 91–102.
- 21 Roth WK, Seifried E: The German experience with NAT. *Transfus Med* 2002;12:255–258.
- 22 Flanagan P, Charlewood G, Horder S, Drawitsky M, Hollis H: Reducing the risk of transfusion transmitted hepatitis B in New Zealand. *Vox Sang* 2005;89:23–24.
- 23 Stolz M, Tinguely C, Graziani M, Fontana S, Gowland P, Buser A, Michel M, Canellini G, Züger M, Schumacher P, Lelie N, Niederhauser C: Efficacy of individual nucleic acid amplification testing in reducing the risk of transfusion-transmitted hepatitis B virus infection in Switzerland, a low endemic region. *Transfusion* 2010;50:2695–2706.
- 24 Kleinman SH, Strong DM, Tegtmeyer GG, Holland PV, Gorlin JB, Cousins C, Chiacchierini RP, Pietrelli LA: Hepatitis B virus (HBV) DNA screening of blood donations in minipools with the COBAS AmpliScreen HBV test. *Transfusion* 2005;45:1247–1257.
- 25 Brojer E, Grabarczyk P, Liszewski G, Mikulska M, Allain JP, Letowska M, Polish Blood Transfusion Service Viral Study Group: Characterization of HBV DNA+/HBsAg- blood donors in Poland identified by triplex NAT. *Hepatology* 2006;44:1666–1674.
- 26 Manzini P, Girotto M, Borsotti R, Giachino O, Guaschino R, Lanteri M, Testa D, Ghiazza P, Vacchini M, Danielle F, Pizzi A, Valpreda C, Castagno F, Curti F, Magistroni P, Abate ML, Smedile A, Rizzetto M: Italian blood donors with anti-HBc and occult hepatitis B virus infection. *Haematologica* 2007;92:1664–1670.
- 27 Katsoulidou A, Moschidis Z, Sypsa V, Chini M, Papa-theodoridis GV, Tassopoulos NC, Mimidis K, Karafoulidou A, Hatzakis A: Analytical and clinical sensitivity of the Procleix Ultrio HIV-1/HCV/HBV assay in samples with a low viral load. *Vox Sang* 2007;92:8–14.
- 28 Nantachit N, Thaikruea L, Thongsawat S, Leetrakool N, Fongsatikul L, Sompan P, Fong YL, Nichols D, Ziermann R, Ness P, Nelson KE: 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;47:1803–1808.
- 29 Vermeulen M, Lelie N, Sykes W, Crokkes R, Swan-eveler J, Gaggia L, Le Roux M, Kuun E, Gulube S, Reddy R: Impact of individual-donation nucleic acid testing on risk of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus transmission by blood transfusion in South Africa. *Transfusion* 2009; 49:1115–1125.
- 30 Owusu-Ofori S, Temple J, Sakrodie F, Anokwa M, Candotti D, Allain JP: Predonation screening of blood donors with rapid tests: implementation and efficacy of a novel approach to blood safety in resource-poor settings. *Transfusion* 2005;45:133–140.
- 31 Wong I, Lam S, Teo D: Overview of nucleic acid testing (NAT) on blood donations in Singapore. *Vox Sang* 2005;89:19–26.
- 32 Makroo RN, Choudhury N, Jagannathan L, Parihar-Malhotra M, Raina V, Chaudhary RK, Marwaha N, Bhatia NK, Ganguly AK: Multicenter evaluation of individual donor nucleic acid testing (NAT) for simultaneous detection of human immunodeficiency virus-1 and hepatitis B and C viruses in Indian blood donors. *Indian J Med Res* 2008;17:140–147.
- 33 Kaic T, Vilicic-Cavlek S, Kurecic Filipovic S, Nemeth-Blazic T, Pem-Novosel I, Vucina VV, Simunovic A, Zajec M, Radic I, Pavlic J, Glamocanin M, Gjenero-Margan I: Epidemiology of viral hepatitis (in Croatian). *Acta Med Croatica* 2013;67:273–279.
- 34 Katsoulidou A, Paraskevis D, Magiorkinis E, Moschidis Z, Haida C, Hatzitheodorou E, Varaklioti A, Karafoulidou A, Hatzitaki M, Kavallierou L, Mouzaki A, Andriotti E, Veneti C, Kaperoni A, Zervou E, Politis C, Hatzakis A: Molecular characterization of occult hepatitis B cases in Greek blood donors. *J Med Virol* 2009;81:815–825.
- 35 Allain JP, Mihaljevic I, Gonzalez-Fraile MI, Gubbe K, Holm-Harritshoj L, Garcia JM, Brojer E, Erikstrup C, Saniewski M, Wernish L, Bianco L, Ullum H, Candotti D, Lelie N, Gerlich WH, Chudy M: Infectivity of blood products from donors with occult hepatitis B virus infection. *Transfusion* 2013;53:1405–1415.
- 36 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.
- 37 Gerlich WH, Wagner FF, Chudy M, Harritshoj LH, Lattermann A, Wienzek S, Glebe D, Saniewski M, Schüttler CG, Wend UC, Willems WR, Bauerfeind U, Jork C, Bein G, Platz P, Ullum H, Dickmeiss E: HBsAg non-reactive HBV infection in blood donors: transmission and pathogenicity. *J Med Virol* 2007;79:32–36.

8. ŽIVOTOPIS

Manuela Miletić rođena je 22. studenog 1971. godine u Mülheim an der Ruhr-u, Njemačka. Osnovnu školu pohađala je i završila u Mošćenici i Petrinji, a srednju u Sisku. Studij medicinske biokemije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je 1990. godine. Diplomirala je 1997. godine i stekla akademski naziv magistre medicinske biokemije. 2001. godine položila je državni ispit pred ispitnom komisijom Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske i tako dobila Odobrenje za samostalni rad. Poslijediplomski studij upisala je 2000. godine, a na doktorski studij prebacila se 2005. godine. 2007. godine upisala je specijalistički studij iz Medicinske biokemije i 2010. godine ga završila, položila ispit i stekla naziv specijaliste medicinske biokemije. Od 2002. godine do danas radi u HZTM-u, i to u Odjelu za dijagnostiku krvlju prenosivih bolesti (OKB), a čija je i voditeljica od 2011. godine.

Aktivno je sudjelovala na brojnom domaćim i međunarodnim tečajevima i znanstvenim skupovima. Autor ili koautor je 29 kongresna priopćenja objavljenima u časopisima indeksiranim u međunarodnoj indeksnoj publikaciji Web of Science Core Collection (WoSCC) te ostala 62 kongresna priopćenja ili sažetka. Održala je niz predavanja na poziv kolega, stručnih društava i proizvođača reagensa, kako na domaćim tako i na međunarodnim skupovima.

Kao član organizacijskih odbora aktivno je sudjelovala u organizacijama kongresa i simpozija Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (HDMBLM). 2014. i 2015. godine bila je tajnica HDMBLM-a, a od 2017. godine zamjenica je predsjednice Nadzornog odbora Sindikata medicinskih biokemičara Hrvatske. Član je Radne grupe za validaciju i verifikaciju metoda Povjerenstva za znanstveno-stručni razvoj HDMBLM-a te član Skupštine društva. 2018. godine dobila je priznanje od HDMBLM-a za istaknut doprinos u radu društva. Od listopada 2019. godine član je ISBT (od *engl.* International Society of Blood Transfusion) radne skupine za TTID (od *engl.* Transfusion Transmitted Infectious Diseases).

Član je HDMBLM-a, Hrvatskog društva za infektivne bolesti, Hrvatskog društva za transfuzijsku medicinu, Hrvatskog društva za biosigurnost i biozaštitu te ISBT-a.

Manuela Miletić majka je dva sina, Antonia (23) i Daniela (20).

Objavljeni znanstveni radovi:

- Adriana Vince, Snježana Židovec Lepej, Jasna Bingulac-Popović, **Manuela Miletić**, Sendi Kuret, Sanda Sardelić, Ivana Baća Vrkela, Ivan Kurelac. Distribution of hepatitis C virus genotypes and subtypes in Croatia: 2008-2015. Central European Journal of Public Health 2018; 26: 159-163.
- Hana Safic Stanic, Ivana Babic, Margareta Maslovic, Dogic Vesna, Jasna Bingulac-Popovic, **Manuela Miletic**, Nina Jurakovic-Loncar, Tomislav Vuk, Maja Strauss-Patko, Irena Jukic. Three-year experience in NAT screening of blood donors for transfusion transmitted viruses in Croatia. Transfusion Medicine and Hemotherapy 2017; 44: 1-6.

Znanstveni rad prihvaćen za objavljivanje 02.05.2019. u časopisu Transfusion Clinique et Biologique:

- **Manuela Miletić**, Jasna Bingulac-Popović, Miljana Stojić Vidović, Ana Hećimović, Mirka Berendika, Ivana Babić, Vesna Đogić, Marko Samardžija, Karmela Barišić, Irena Jukić, Ivanka Mihaljević. Anti-HBc prevalence among Croatian blood donors in a 14-year period (2004-2017): assessment of trends, risks and need for implementing routine testing. doi: 10.1016/j.traccli.2019.05.001, *elektronička objava prije tiskane*

Znanstveni rad prihvaćen za objavljivanje 18.06.2019. u časopisu Transfusion Clinique et Biologique:

- **Manuela Miletić**, Tomislav Vuk, Ana Hećimović, Miljana Stojić Vidović, Lorena Jemeršić, Irena Jukić. Estimation of the Hepatitis E Assay-dependent Seroprevalence Among Croatian Blood Donors. doi: 10.1016/j.traccli.2019.06.234, *elektronička objava prije tiskane*

Stručni rad objavljen u Infektološkom glasniku:

Mihaljević Ivanka, **Miletić Lovrić Manuela**, Balija Melita, Jukić Irena, Bušić Mirela. Analiza i rezultati serološkog testiranja donora organa u Hrvatskoj 2006.-2012. Infektološki glasnik 2013; 3: 117-125.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Doktorski rad

VAŽNOST DETEKCIJE PROTUTIJELA NA SRŽNI ANTIGEN U IDENTIFIKACIJI DOBROVOLJNIH DAVATELJA KRVI S OKULTNOM INFEKCIJOM VIRUSOM HEPATITISA B

Manuela Miletić

SAŽETAK

Okultna infekcija virusom hepatitisa B (OBI) u davatelja krvi najčešći je uzrok prijenosa virusa hepatitisa B (HBV) transfuzijama krvnih pripravaka. OBI se definira kao prisutnost virusne DNA bez prisustva HBsAg-a u krvi izvan tzv. *window* perioda infekcije. HBV DNA može se dokazati u jetri, a u krvi je uglavnom nedokaziva ili intermitentna jer je virusni titar nizak, najčešće manji od 100, često i od 10 IU HBV DNA/mL. Kod OBI-ja nisu nužno prisutna specifična protutijela na virusne antigene, međutim ako jesu (seropozitivni OBI), najčešće su prisutna protutijela na sržni antigen, anti-HBc. Obzirom na negativan rezultat HBsAg-a i intermitentnu viremiju, prisutna anti-HBc jedini su biljeg koji može upućivati na OBI.

Glavni cilj i svrha ovog istraživanja bio je odrediti prevalenciju anti-HBc-a u populaciji dobrovoljnih davatelja krvi (DDK) Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu (HZTM), ukupnu te prema dobi, spolu i broju davanja krvi DDK-a, utvrditi važnost određivanja anti-HBc-a u detekciji OBI-ja, prevalenciju OBI-ja u populaciji DDK-a i procijeniti rizik od prijenosa HBV transfuzijama krvi uključujući DDK-e s OBI-jem. U tom smislu ispitana je prisutnost anti-HBc-a i protutijela na druge antigene HBV-a te virusne DNA u arhivskim uzorcima krvi DDK HZTM-a iz 2004. (7561 uzoraka) i 2013. godine (7318 uzoraka) te prospektivno u 2017. godini (5090 uzoraka).

Zabilježen je značajan pada prevalencije anti-HBc-a u populaciji DDK-a HZTM-a, i to 4 puta, s 5,24 % na 1,32 %, što je uglavnom posljedica pada prevalencije u višestrukih davatelja krvi s 5,90 % na 1,38 %. Serološki HBV profili anti-HBc pozitivnih DDK-a nisu se značajno promijenili u ispitivanom periodu: udjeli anti-HBs-a, anti-HBe-a i anti-HBc-only pozitivnih DDK-a bili su podjednaki su sve tri ispitne godine. Nije bilo HBeAg niti anti-HBc IgM pozitivnih DDK-a. Srednja izračunata avidnost anti-HBc IgG-a je 0,92 što upućuje na davni kontakt s HBV-om. Prevalencija anti-HBc-a u populaciji DDK HZTM-a od 1:19 u 2013. i 1:76 u 2017. godini, značajno je viša od prevalencije DDK-a s OBI-jem, koja je 2013. bila 1:11.213, a 2017. godine 1:30.932. Ostatni rizik za 2004. godinu iznosi 1:14.925; za 2013. godinu 1:11.363; za 2017. godinu 1:83.333. Ostatni rizik ima silazni trend. Eliminacijom svih anti-HBc pozitivnih trebalo bi nadoknaditi minimalno 1,32 % DDK-a.

Rad predstavlja originalni znanstveni doprinos u potvrdi važnosti anti-HBc testa u otkrivanju DDK-a s mogućim OBI-jem, u slučajevima intermitentne HBV DNA viremije, te u odabiru strategije ispitivanja DDK-a na anti-HBc, uz postojeći panel HBsAg i ID-NAT (od *engl.* Individual Donor-Nucleic Acid Testing) u Republici Hrvatskoj, što bi bila dodatna mjera u sprječavanju prijenosa HBV-a krvlju i krvnim pripravcima.

Rad je pohranjen u Centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 159 stranica, 43 slika, 18 tablica i 204 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.
Ključne riječi: dobrovoljni davatelji krvi, prevalencija anti-HBc-a, okultna infekcija virusom hepatitisa B (OBI)
Mentor: **Prof. dr. sc. Karmela Barišić**, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Ocjenjivači: **Doc. dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Dr. sc. Jasna Bingulac-Popović, znanstveni savjetnik, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu
Izv. prof. dr. sc. Marina Samardžija, Medicinski fakultet Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku

Rad prihvaćen: 20.11.2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Doctoral thesis

THE SIGNIFANCE OF ANTI-HBc DETECTION IN IDENTIFICATION OF VOLUNTEER BLOOD DONORS WITH OCCULT HEPATITIS B VIRUS INFECTION IN CROATIA

Manuela Miletić

SUMMARY

Occult hepatitis B virus infection (OBI) in blood donors (BDs) is the most common cause of transmission of hepatitis B (HBV) by blood products. OBI is defined as the presence of HBV DNA with no detectable surface antigen, HBsAg, in blood, excluding the window period, with or without any specific HBV antibodies, and if the antibodies are present (seropositive OBI), they are mostly specific antibodies to the core antigen, anti-HBc. The efficiency of anti-HBc tests is sometimes greater than the efficiency of NAT (Nucleic Acid Testing) tests, in cases of very low HBV DNA viral load, which approximately corresponds to the lower limit of sensitivity of the NAT method. Those are mostly donors with less than HBV DNA 10 IU/mL of blood.

The objective of the proposed doctoral thesis was to determine the seroprevalence of anti-HBc, the importance of determining anti-HBc in OBI, the prevalence of OBI among BDs and to evaluate the risk of transmission of HBV including BDs with OBI. For this purpose archived samples of BDs of the Croatian Institute of Transfusion Medicine (CITM) from 2004 (7561) and 2013 (7318) and prospectively in 2017 (5090) were analyzed for the presence of anti-HBc and other HBV antibodies and viral DNA.

During the period 2004-2017, a significant 4-times decrease in anti-HBc prevalence in Croatian BDs from 5.24 % to 1.32 % was observed. Serological HBV profiles of anti-HBc positive BDs did not change significantly during the study period: the shares of anti-HBs, anti-HBe, and anti-HBc-only positive BDs were equal in all three testing years. There was no HBeAg or anti-HBc IgM positive BDs. The mean calculated avidity of anti-HBc IgG is 0.92 which indicates long-standing contact with HBV. The prevalence of anti-HBc in the population of BDs in the CITM was 1:19 in 2013 and 1:76 in 2017 and is significantly higher than the prevalence of OBI BDs, which was 1:11.213 in 2013 and 2017 1:30.932. The residual risk for 2004 is 1:14.925; for 2013 1:11.363; for 2017 1:83.333. The residual risk has a decline trend. No OBI infection among anti-HBc positive BDs was detected in this study. By deferring all anti-HBc positive donors, at least 1.32 % of BDs should be substituted.

The results of this work present original scientific contribution about the anti-HBc seroprevalence in BDs, the incidence of OBI BDs and risk of transmission of HBV including blood products from OBI donors. Due to the high consistency of anti-HBc in Croatian OBI BDs, a strategy of universal testing of BDs for this marker in addition to existing HBsAg and ID-NAT screening in Croatia would represent an additional measure to prevent HBV transmission by blood and blood components

The thesis is deposited in the Central Library of Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 159 pages, 43 figures, 18 tables i 204 references. Original is in Croatian language.

Key words: blood donors, anti-HBc prevalence, occult hepatitis B virus infection (OBI)

Supervisor: **Professor Karmela Barišić, Ph.D.**, *Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb*

Reviewers: **Assistant professor Sandra Šupraha Goreta, Ph. D.**, *Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb*
Jasna Bingulac-Popović, Ph.D., *Scientific Adviser, Croatian Institute of Transfusion Medicine*

Associated Professor Marina Samardžija, Ph.D., *Osijek School of Medicine University of J. J. Strossmayer Osijek*

Thesis accepted: November 20th, 2019