

Journal of Transfusion Medicine

ISSN 1689-6017
e-ISSN 2080-1505

Rok 2021, tom 14, nr 2

Immunizacja bierna w walce z chorobami zakaźnymi, w tym z COVID-19

*Passive immunization in the combat against infectious diseases
(COVID-19 included)*

Joanna Lasocka, Artur Bielawski, Elżbieta Lachert

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

*Strategies for hepatitis B virus screening of Polish blood donors
(2005–2020)*

Aneta Kopacz, Piotr Grabarczyk

Hemafereza lecznicza w świetle danych przedstawionych w czasie 36. Międzynarodowego Kongresu ISBT (kongres wirtualny, 12–16 grudnia 2020 r.). Cześć II — cytaferesa lecznicza

*Therapeutic hemapheresis in light of the presentations at the 36th
International ISBT Congress Virtual meeting, 12–16 December 2020.
Part II — therapeutic cytaferesis*

Aleksandra Rosiek



dla lekarzy



dla pacjentów



dla studentów

Ogromna oferta wydawnicza obejmująca pozycje skierowane do lekarzy i pacjentów, książki autorów polskich i zagranicznych z dziedziny medycyny jest dostępna w jednym miejscu — księgarni internetowej IKAMED!



książki



czasopisma



e-booki



**rabaty dla
stałych klientów**



sprzęt medyczny



**książki sprowadzane
na zamówienie**

**Zapraszamy do zaponania się
z ofertą IKAMED już teraz!**

www.ikamed.pl



Journal of Transfusion Medicine

Rok 2021, tom 14, nr 2

ISSN 1689-6017
e-ISSN 2080-1505

Redaktor naczelna: Magdalena Łętowska
Zastępca redaktora naczelnego: Jerzy Windyga
Sekretarz redakcji: Krystyna Dudziak
Redaktor prowadzący: Izabela Hallmann
Redaktorzy działów:
Transfuzjologia kliniczna: Ryszard Pogłód
Transfuzjologia laboratoryjna: Piotr Grabarczyk
Hematologia i Hemostaza: Jerzy Windyga

Rada Naukowa:

Jean Pierre Allain (Anglia), Margarida Amil Diaz (Portugalia), Jolanta Antoniewicz-Papis, Ewa Brojer, Przemysław Juszczynski, Elżbieta Lachert, Ewa Lech-Marańda, Miquel Lozano (Hiszpania), Mario Muon (Portugalia), Piotr Paluszkiwicz, Aleksandra Rosiek, Erwin Scharberg (Niemcy), Zbigniew Szczepiórkowski (Stany Zjednoczone)

Journal of Transfusion Medicine (ISSN 1689-6017, eISSN 2080-1505) jest czasopismem wydawanym cztery razy w roku przez VM Media sp. z o.o. VM Group sp.k., ul. Świętokrzyska 73, 80-180 Gdańsk, tel.: 58 320 94 94; faks: 58 320 94 60; e-mail: viamedica@viamedica.pl; www.viamedica.pl

Wersja elektroniczna czasopisma znajduje się na stronie: <https://journals.viamedica.pl>

Adres Redakcji:

Instytut Hematologii i Transfuzjologii
Zakład Transfuzjologii
ul. Indiry Gandhi 14, 02-776 Warszawa
tel.: 22 349 63 71, tel./faks: 22 349 63 72
e-mail: bloodorg@ihit.waw.pl

Zasady edycji i informacje dla autorów zamieszczono na stronie www.jtm.viamedica.pl

Przenumerata w wersji elektronicznej jest bezpłatna
https://journals.viamedica.pl/journal_of_transfusion_medicine/about/subscriptions

Reklamy: należy kontaktować się z wydawnictwem Via Medica, tel.: (58) 320 94 94; e-mail: dsk@viamedica.pl
Redakcja nie ponosi odpowiedzialności za treść reklam.

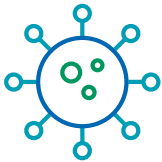
Wszelkie prawa zastrzeżone, włącznie z tłumaczeniem na języki obce. Żaden fragment tego czasopisma zarówno tekstu, jak i grafiki nie może być wykorzystywany w jakiegokolwiek formie. W szczególności zabronione jest dokonywanie reprodukcji oraz przekładanie na język mechaniczny lub elektroniczny, a także utrwalanie w jakiegokolwiek postaci, przechowywanie w jakimkolwiek układzie pamięci oraz transmitowanie, czy to w formie elektronicznej, mechanicznej czy za pomocą fotokopii, mikrofilmu, nagrań, skanów bądź w jakikolwiek inny sposób, bez wcześniejszej pisemnej zgody wydawcy. Prawa wydawcy podlegają ochronie przez krajowe prawo autorskie oraz konwencje międzynarodowe, a ich naruszenie jest ścigane pod sankcją karną.

Czasopismo jest indeksowane w bazach CrossRef, EBSCO, Free Medical Journals, Google Scholar, Głównej Biblioteki Lekarskiej, Index Copernicus (70,61), Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (20), Polskiej Bibliografii Naukowej, Ulrich's Periodicals Directory, WorldCat.



cobas[®] SARS-CoV-2

Szybkie i wydajne testy zapewniające wiarygodne wyniki i identyfikację wariantów SARS-CoV-2



cobas[®] SARS-CoV-2 Test[†]

Test RT-PCR wykrywający i różnicujący dwa regiony SARS-CoV-2

cobas[®] SARS-CoV-2 Variant Set 1 Test^{*}

Test RT-PCR wykrywający i różnicujący mutacje N501Y, E484K i del 69-70 wirusa SARS-CoV-2

cobas[®] SARS-CoV-2 & Influenza A/B Test

Test RT-PCR wykrywający i różnicujący dwa regiony SARS-CoV-2, oraz wirusa grypy A i grypy B



cobas[®] Liat

- Jedna próbka, jeden test, 20 minut
- Prosty, intuicyjny przebieg badania
- Do wykonania na oddziale lub w laboratorium



cobas[®] 6800

- Absolutna automatyzacja od przyjęcia próbki do uzyskania wyniku
- Niezrównana wydajność; pierwsze 96 wyników w 3 godz., w sumie 1440 wyników w ciągu 24 godz.

[†]Test dostępny na cobas 6800, w przygotowaniu na cobas Liat, ^{*}Test dostępny na cobas 6800, przeznaczony do badań naukowych

COBAS jest znakiem towarowym firmy Roche.

© 2021 Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o. Wszelkie prawa zastrzeżone.

Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o.

ul. Bobrowiecka 8

00-728 Warszawa

tel. +48 22 481 55 55

www.diagnostics.roche.com

www.roche.pl





Journal of Transfusion Medicine

2021, tom 14, nr 2

ISSN 1689-6017
e-ISSN 2080-1505

SPIS TREŚCI

ARTYKUŁY POGLĄDOWE

Immunizacja bierna w walce z chorobami zakaźnymi, w tym z COVID-19
Joanna Lasocka, Artur Bielawski, Elżbieta Lachert 41

Metodyka identyfikacji zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu B u dawców krwi w Polsce w latach 2005–2020
Aneta Kopacz, Piotr Grabarczyk 58

SPRAWOZDANIE

Hemafereza lecznicza w świetle danych przedstawionych w czasie 36. Międzynarodowego Kongresu ISBT (kongres wirtualny, 12–16 grudnia 2020 r.). Część II — cytafereza lecznicza
Therapeutic hemapheresis in light of the presentations at the 36th International ISBT Congress Virtual meeting, 12–16 December 2020. Part II — therapeutic cytapheresis
Aleksandra Rosiek 87

CONTENTS

REVIEW ARTICLES

Passive immunization in the combat against infectious diseases (COVID-19 included)
Joanna Lasocka, Artur Bielawski, Elżbieta Lachert 50

Strategies for hepatitis B virus screening of Polish blood donors (2005–2020)
Aneta Kopacz, Piotr Grabarczyk 73

Immunizacja bierna w walce z chorobami zakaźnymi, w tym z COVID-19

Joanna Lasocka¹, Artur Bielawski², Elżbieta Lachert¹

¹Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

²„BIOMED-LUBLIN” Wytwórnia Surowic i Szczepionek S.A.

Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Lasocka J, Bielawski A, Lachert E. Passive immunization in the combat against infectious diseases (COVID-19 included). J Transf Med 2021; 14 (2): 50–57. DOI: 10.5603/JTM.2021.0004.

Należy cytować wersję pierwotną.

Streszczenie

Immunizacja bierna (odporność bierna, immunoterapia bierna, uodparnianie bierne) polega na podaniu specyficznych przeciwciał, których organizm nie posiada, w celu zapobiegania wystąpieniu lub leczenia choroby. Immunizacja bierna może być nabyta w sposób naturalny (przenoszenie przeciwciał matczynych przez łożysko do płodu) oraz sztuczny, gdy pacjentowi przetacza się wysokie miana przeciwciał uzyskanych od ludzi, zwierząt lub metodami inżynierii genetycznej (przeciwciała monoklonalne). Początki stosowania immunizacji biernej sięgają końca XIX wieku. Pionierem badań nad wykorzystaniem przeciwciał pochodzenia zwierzęcego w terapii błonicy i tężca był Emil Adolf von Behring. W Polsce, w powstałym w 1951 roku Zakładzie Produkcji Surowiec i Szczepionek z siedzibą w Lublinie, na skalę przemysłową wytwarzano surowice odpornościowe do walki z błonicą, płonicą, odrą, meningokokowym zapaleniem opon mózgowych czy przeciwko chorobie Heinego-Medina.

Uodparnianie bierne stosowane jest w celu zapobiegania chorobom, w leczeniu chorób związanych z niedoborem odporności (m.in. hipogammaglobulinemii) oraz ostrych infekcji i zatruc. Odporność wynikająca z biernej immunizacji utrzymuje się od kilku tygodni do około 4 miesięcy.

W związku z trwającą od grudnia 2019 roku pandemią COVID-19 w toku są liczne badania z randomizacją, mające określić skuteczność terapii osoczem ozdrowieńców w przypadku zakażenia wirusem SARS-CoV-2. W celu zminimalizowania działań niepożądanych po podaniu osocza ozdrowieńców podjęto próby wytworzenia hiperimmunizowanej globuliny anty-SARS-CoV-2 (hIVIg). Należy wspomnieć, że w fazie badań klinicznych jest między innymi koncentrat immunoglobuliny anty-SARS-CoV-2 opracowany przez polskich badaczy pod kierownictwem profesora Tomasiewicza we współpracy z Instytutem Hematologii i Transfuzjologii oraz z firmą BIOMED-LUBLIN (projekt nr 2020/ABM/COVID19/0036).

Słowa kluczowe: immunizacja bierna, osocze ozdrowieńców, SARS-CoV-2, COVID-19, immunoglobulina anty-SARS-CoV-2

J. Transf. Med. 2021; 14: 41–49

Adres do korespondencji: dr n. med. Joanna Lasocka, Zakład Transfuzjologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Indiry Gandhi 14, 02–776 Warszawa; tel. (22) 34 96 386, e-mail: jlasocka@ihit.waw.pl

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

Immunizacja bierna

Immunizacja bierna (odporność bierna, immunoterapia bierna, uodparnianie bierne) polega na podaniu specyficznych przeciwciał, których organizm nie posiada, w celu zapobiegania wystąpieniu lub leczenia choroby.

Immunizacja bierna może być nabyta:

- w sposób naturalny, w przypadku gdy przeciwciała matczyne są przenoszone do płodu przez łożysko;
- w sposób sztuczny, w przypadku gdy pacjentowi przetacza się wysokie miana przeciwciał specyficznych dla czynnika zakaźnego lub toksyny (uzyskanych od ludzi lub zwierząt).

Uodparnianie bierne stosuje się w sytuacji, gdy istnieje wysokie ryzyko infekcji i czas, aby organizm rozwinął własną odpowiedź immunologiczną, jest niewystarczający, lub po to, by zmniejszyć objawy chorób. Uodparnianie bierne można przeprowadzić, kiedy pacjenci nie mogą syntetyzować przeciwciał lub jeśli zostali narażeni na chorobę, na którą nie mają odporności.

Immunizacja bierna nabyta naturalnie

Naturalną formę biernej immunoterapii stanowią immunoglobuliny klasy G (IgG) matki, które przechodzą czynnie przez łożysko do krwiobiegu płodu. W procesie tym uczestniczą receptory dla fragmentu Fc IgG obecne na komórkach trofoblastu. Wraz z mlekiem matki dziecku dostarczane są także wydzielnicze przeciwciała IgA, których działanie związane jest głównie z obszarem błon śluzowych, w tym błon śluzowych przewodu pokarmowego [1]. Przeciwciała IgM zaczynają się pojawiać już w okresie płodowym, natomiast wytwarzanie przeciwciał IgG rozpoczyna się tuż po urodzeniu, aby po 12 miesiącach osiągnąć około 60% miana wykrywanego u osób dorosłych. Z upływem czasu poziom przeciwciał matczynych stopniowo się obniża, zanikając około 9. miesiąca życia dziecka. W około 2.–3. miesiącu życia miano przeciwciał IgG jest najniższe. Przeciwciała matczyne są bardzo skuteczne w ochronie noworodków i niemowląt przeciwko większości chorób zakaźnych. Najbardziej dobitnym tego przykładem są dzieci z ciężkim złożonym niedoborem odporności (SCID, *severe combined immunodeficiency*), u których kliniczne objawy choroby zwykle pojawiają się po 6. miesiącu życia, czyli w momencie, gdy miano matczynych przeciwciał osiąga najniższy poziom [2, 3].

Kolejnym dowodem na związek między odpornością matki a odpornością niemowlęcia jest fakt, że prevalencja przeciwciał przeciwko wirusom wśród nie-

nowłąt w wieku poniżej 1. miesiąca jest niezwykle podobna do obserwowanej u dorosłych w wieku 20–40 lat, czyli w grupie wiekowej matek [4].

Immunizacja bierna nabyta sztucznie

Podanie przeciwciał znajdujących się w osoczu krwi ludzkiej lub zwierzęcej, przeciwciał monoklonalnych (MAb, *monoclonal antibodies*), przeciwciał zawartych w produktach leczniczych krwiopochodnych, takich jak immunoglobulina ludzka do stosowania dożylnego (IVIg, *intravenous immunoglobulin*) lub domięśniowego (IMIg, *intramuscular immunoglobulin*), immunoglobulina specyficzna od dawców immunizowanych czy jako terapia osoczem ozdowieńców (CPT, *convalescent plasma therapy*), zapewnia krótkotrwałą immunizację bierną, nabytą w sposób sztuczny.

Uodparnianie bierne stosowane jest w celu zapobiegania chorobom, w leczeniu chorób związanych z niedoborem odporności (m.in. hipogammaglobulinemii) oraz ostrych infekcji i zatruc. Odporność wynikająca z biernej immunizacji utrzymuje się od kilku tygodni do około 4 miesięcy.

Rys historyczny i zastosowanie immunizacji biernej

Pierwsze skuteczne próby biernej immunizacji (badania na modelu zwierzęcym) w celu leczenia błonicy i tężca opublikowano w 1890 roku w „*Deutsche Medizinische Wochenschrift, German Medical Journal*” [5]. Metoda ta została dość szybko zmodyfikowana i przystosowana do użytku klinicznego. Już w połowie lat 90. XIX wieku w szpitalach z powodzeniem stosowano antytoksynę swoistą dla błonicy w celu zmniejszenia śmiertelności podczas wybuchów epidemii tej choroby. W 1901 roku Emil Adolf von Behring został laureatem pierwszej Nagrody Nobla w dziedzinie medycyny za prace nad zastosowaniem seroterapii w walce z błonicy (difterytem). Komitet Noblowski podkreślił znaczenie pracy von Behringa, dodając do uzasadnienia słowa: „dzięki pracy [von Behringa] otwarta została nowa droga dla medycyny, a lekarze otrzymali ważną broń w walce przeciw chorobie i śmierci”.

Tylko w Niemczech, jak oszacowano, co roku ratowano 45 000 chorych dzięki zastosowaniu immunoterapii (środków specyficznych dla błonicy). W latach 90. XIX wieku śmiertelność wśród chorych hospitalizowanych z powodu błonicy wynosiła 47–60%, a działania podejmowane przez Emila von Behringa i jego współpracownika, Shibasaburo Kitasato, stanowiły jedyną nadzieję dla chorych na błonicy w erze przed antybiotykoterapią.

Podobne doświadczenia na modelu zwierzęcym von Behring i Kitasato przeprowadzili z bakterią *Clostridium tetani*. Krew królików immunizowana *C. tetani* całkowicie zabezpieczała myszy przed zwykle śmiertelną dawką wirulentnych bakterii oraz przed toksyną tężcową. Na podstawie wyników tych badań zaczęto produkować specyficzną immunoglobulinę antytężcową [5].

W pierwszych latach stosowania immunoterapii biernej, ze względu na fakt, że niemożliwe było pozyskanie przeciwciał ludzkich na szeroką skalę, próbowano uzyskiwać je od zwierząt. Na przykład immunoglobulinę przeciwko błonicy pozyskiwano od immunizowanych krów [6]. Wprawdzie obecnie technologia otrzymywania specyficznych immunoglobulin uległa znacznej modyfikacji, nadal jednak część specyficznych immunoglobulin jest pochodzenia zwierzęcego, np. Antivenin, firmy Merc & Co. — immunoglobulina pochodzenia końskiego, która neutralizuje neurotoksynę jadowitego pająka *Latrodectus mactans* (czarna wdowa) czy antytoksyna botulinowa Botulism Antitoxin Bivalent Types A and B — immunoglobulina końska firmy Sanofi Pasteur stosowana zapobiegawczo i leczniczo w przypadkach zatrucia jadem kielbasianym.

Klasyczne podejście do wytwarzania przeciwciał opiera się na immunizacji zwierzęcia określonym antygenem i izolacji specyficznych przeciwciał z krwi gospodarza. Jednak białka pochodzenia zwierzęcego pomimo zaawansowanych technik inżynierii mogą powodować szereg niepożądanych reakcji, które wynikają z ich immunogenności. Dlatego też immunoterapia bierna, w której stosowane są preparaty przeciwciał pochodzenia zwierzęcego, powinna być prowadzona wyłącznie pod ścisłym nadzorem medycznym.

Począwszy od lat 20. do lat 70. XX wieku, immunizację bierną stosowano na szeroką skalę w przypadku chorób takich jak szkarlatyna i krztusiec [7].

Preparaty zawierające immunoglobulinę ludzką są stosowane m.in. w leczeniu pierwotnego niedoboru odporności z upośledzeniem wytwarzania przeciwciał, błonicy, tężca, zapalenia wątroby typu A oraz B (HAV, *hepatitis A virus*; HBV, *hepatitis B virus*), wścieklizny, odry, ospy, pierwotnej małopłytkowości immunologicznej, w chorobie Kawasaki, w wirusowym zakażeniu dolnych dróg oddechowych oraz jako profilaktyka konfliktu matczyno-płodowego i w następstwie choroby hemolitycznej płodu i noworodka.

Profilaktyczne podawanie przeciwciał przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B (WZW B)

zostało w dużej mierze wyparte przez wprowadzenie szczepionek, nadal jednak immunoprofilaktyka WZW B jest wskazana w sytuacji przypadkowego narażenia osób nieimmunizowanych (w tym takich, u których szczepienie nie zostało zakończone lub których status szczepienia jest nieznan), np.: u osób hospitalizowanych, szczególnie narażonych na zakażenie WZW B, u partnerów seksualnych osób chorych na ostre WZW B czy u personelu medycznego w przypadku zakłucia, skaleczenia, zanieczyszczenia rany krwią lub innymi płynami ustrojowymi pacjenta zakażonego WZW B. Immunoprofilaktykę WZW B stosuje się także u noworodków, których matki są nosicielkami HBV [8].

Preparaty immunoglobulin ludzkich powodują ograniczenie lub remisję objawów niektórych ogólnoustrojowych chorób zapalnych i autoimmunizacyjnych.

Fracjonowanie białek osocza krwi w celu otrzymania produktów leczniczych krwiopochodnych stało się możliwe dzięki opracowanej w latach 40. XX wieku i funkcjonującej do dziś (choć zmodyfikowanej) metodzie Cohna [9]. Źródłem osocza do frakcjonowania jest świeżo mrożone osocze (FFP, *fresh frozen plasma*), pobierane w centrach krwiodawstwa i krwiolecznictwa (CKiK; w Polsce znajdują się 23 takie centra). Wprawdzie jednostki osocza przeznaczone do frakcjonowania są poddawane rygorystycznym procedurom ograniczającym ryzyko przeniesienia czynników zakaźnych, w tym badaniom markerów czynników zakaźnych [wirus zapalenia wątroby typu B (HBV), wirus zapalenia wątroby typu C (HCV, *hepatitis C virus*), ludzki wirus niedoboru odporności (HIV, *human immunodeficiency virus*)], to jednak ryzyka związanego z przeniesieniem czynników zakaźnych nadal nie można całkowicie wyeliminować. Dlatego też zarówno osocze, jak i produkty lecznicze krwiopochodne otrzymywane ze zlewanego osocza od lat 80. XX wieku poddawane są metodom inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych.

Używane do wytwarzania produktów leczniczych osocze zawierające immunoglobulinę ludzką różni się mianem poszczególnych przeciwciał specyficznych. Dobór osocza o określonym wskazaniu wynika z chęci osiągnięcia najbardziej optymalnego działania terapeutycznego w danej jednostce chorobowej. Jednym z takich preparatów, które bierze się pod uwagę, jest immunoglobulina dożylna (IVIg).

Wraz z rozwojem nowych technologii, zwłaszcza w zakresie otrzymywania MAb, pojawiły się metody, które ograniczyły zapotrzebowanie na przeciwciała pochodzenia zwierzęcego.

Alternatywnym sposobem otrzymywania przeciwciał okazała się technika prezentacji na fagu (*phage display*), która wykorzystuje techniki inżynierii genetycznej do modyfikacji genomu bakteriofagów i tworzenia bibliotek zawierających miliony wariantów rekombinowanych białek prezentowanych na ich powierzchni. Korzystanie z bibliotek fagowych umożliwia izolację funkcjonalnych i wysoce specyficznych fragmentów przeciwciał o praktycznie dowolnej swoistości. Metoda ta została po raz pierwszy opisana w 1985 roku przez Georga Smitha [10, 11].

Biblioteki fagowe są konstruowane w oparciu o najmniejsze funkcjonalne fragmenty przeciwciała odpowiedzialne za oddziaływanie z antygenem — fragmenty scFv (*single chain fragment variable*).

Biblioteki przeciwciał można pozyskać poprzez przygotowanie matrycy cDNA z komórek B nieimmunizowanych ludzkich dawców i amplifikację fragmentów V_H i V_L przeciwciał lub skonstruowanie przeciwciał na podstawie mutacji aminokwasowych wprowadzanych losowo w pętli CDR (*complementary determining regions*). W ten sposób generuje się pulę wariantów przeciwciał o różnych sekwencjach, które są prezentowane na powierzchni fagów. Podczas przeszukiwania bibliotek fagowych z puli fagów wybiera się te specyficznie oddziałujące z wybranym antygenem [12].

Warianty przeciwciał uzyskane metodą *phage display* mogą zostać dodatkowo poddane procesowi dojrzewania powinowactwa (*affinity maturation*). Technika ta naśladuje naturalnie zachodzący proces wytwarzania przeciwciał o coraz większym powinowactwie do antygeny. W laboratorium poprzez konstrukcję bibliotek II generacji można uzyskać podobny efekt, otrzymując na bazie wyizolowanego przeciwciała warianty o zwiększonej sile oddziaływania z antygenem [13].

Uzyskane w wyniku selekcji fragmenty przeciwciał są poddawane analizie przesiewowej [np. za pomocą testu immunoenzymatycznego (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*)] oraz sekwencjonowaniu. Fragmenty przeciwciał wyprodukowane w systemach bakteryjnych są następnie oczyszczane na złożach chromatograficznych. Analiza właściwości wyselekcjonowanych przeciwciał pozwala na wyznaczenie dokładnych stałych kinetycznych oddziaływania przeciwciała z antygenem.

W opisany sposób produkuje się przeciwciała w formie scFv przeciwko haptenom, białkom, węglowodanom, receptorom, antygenom nowotworowym czy wirusom. Mogą one mieć zastosowanie terapeutyczne bądź być wykorzystywane w różnych zestawach diagnostycznych.

Do celów terapeutycznych przeciwciała mogą być dodatkowo koniugowane z cytostatykami lub izotopami promieniotwórczymi, aby umożliwić dostarczenie leku lub znacznika do ściśle określonych tkanek. Technologię *phage display* z powodzeniem wykorzystuje wiele firm farmaceutycznych poszukujących leków biologicznych. Przykładem dostępnych na rynku ludzkich przeciwciał terapeutycznych otrzymanych przy użyciu techniki *phage display* są: Humira (adalimumab) — przeciwciało skierowane przeciwko czynnikowi martwicy nowotworu α (TNF α , *tumor necrosis factor α*), stosowane m.in. w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów, czy Benlysta (belimumab) — ludzkie przeciwciało IgG1 skierowane przeciwko stymulatorowi limfocytów B (BLyS, *B lymphocyte stimulator*), rozpuszczalnemu ligandowi z rodziny cytokin TNF, które są stosowane w leczeniu toczenia rumieniowatego układowego. W trakcie badań klinicznych znajdują się kolejne przeciwciała otrzymane z bibliotek fagowych [14].

Potwierdza to słuszność i skuteczność wykorzystywania techniki prezentacji na fagu do otrzymywania wysoce specyficznych ludzkich przeciwciał o potencjale terapeutycznym. Opracowano także inne technologie, oparte na chimericznych MAb, w których przeciwciało mysie jest „uczułowiczone”. Polega to na zastąpieniu mysich genów immunoglobulin przez geny immunoglobuliny ludzkiej [15].

Profilaktyka swoista bierna w chorobach zakaźnych w Polsce

Pierwsze lata po wojnie pokazały, jak ogromne znaczenie w walce z rozwojem chorób zakaźnych ma immunoterapia bierna. W rezultacie działań wojennych na terenie Polski, migracji ludności oraz wojsk sytuacja epidemiczna była wręcz dramatyczna.

We współpracy z kadrą profesorów – naukowców z przedwojennych ośrodków uniwersyteckich we Lwowie, w Warszawie i Poznaniu – w 1944 roku powołano Państwowy Zakład Higieny (PZH) z siedzibą w Lublinie. Główne zadania PZH obejmowały przygotowanie, wdrożenie i nadzorowanie wszystkich działań z zakresu ochrony ludności przed rozprzestrzenianiem się chorób zakaźnych.

W 1951 roku będący jedną ze struktur PZH Zakład Produkcji Surowic i Szczepionek został przekształcony w Wytwórnę Surowic i Szczepionek, z której powstała działająca do dzisiaj spółka akcyjna „BIOMED-LUBLIN” Wytwórnia Surowic i Szczepionek. Był to pierwszy w Polsce zakład

farmaceutyczny o profilu biotechnologicznym. Opracowywane i wytwarzane tutaj immunopreparaty przez długie lata stanowiły kluczowy element narodowego systemu ochrony przed chorobami zakaźnymi.

To tu rozpoczęto produkcję na skalę przemysłową pierwszych w kraju i w Europie Środkowej surowic odpornościowych do walki z błonicą, surowicy meningokokowej (przeciw zapaleniu opon mózgowych), surowicy przeciw odrze oraz surowicy przeciw płonicy. Surowice przeciwężcowa, przeciwbłonicza, przeciwpłonicza i przeciwmeningokowa wytwarzane były na bazie krwi koni poddanych hiperimmunizacji. Surowica przeciwdrożdżowca była wytwarzana na bazie krwi pobieranej od ludzi — ozdrowieńców.

Nie sposób przecenić ogromnego znaczenia wymienionych surowic w zwalczaniu tężca, błonicy, płonicy, odrzy czy choroby Heinego–Medina w Polsce. Obecnie te choroby są w naszym kraju opanowane, kontrolowane, a produkcja związanych z nimi immunoglobulin została zamknięta.

Immunoglobulina dożylna (IVIg) a immunoglobulina specyficzna w leczeniu COVID-19

W Stanach Zjednoczonych immunoglobulina dożylna została zatwierdzona do użytku klinicznego w 1980 roku. Stwierdzono, że jest skuteczna w profilaktyce zakażeń zagrażających życiu u pacjentów z pierwotnymi i wtórnymi niedoborami odporności. IVIg stosuje się w leczeniu przewlekłych zakażeń, takich m.in. jak zakażenie parwowirusem B19.

Doświadczenie dotyczące stosowania IVIg w leczeniu zakażenia koronawirusem 2 ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (SARS-CoV-2, *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) jest obecnie bardzo ograniczone. Uzasadnienie stosowania IVIg w zakażeniu SARS-CoV-2 stanowi przede wszystkim modulacja reakcji zapalnej. Stwierdzono bowiem, że IVIg zmniejsza odpowiedź zapalną w ciężkich zakażeniach SARS-CoV-2. W publikacjach z Chin poinformowano o stosowaniu IVIg u zakażonych SARS-CoV-2 pacjentów w ciężkim stanie, u których w efekcie stwierdzono normalizację temperatury i złagodzenie objawów ze strony układu oddechowego. Wyników tych nie można jednak uznawać za jednoznaczne, ponieważ chorzy otrzymywali także leki przeciwwirusowe i steroidy, które mogły zaburzyć ocenę wpływu samej immunoglobuliny [16]. Można zatem stwierdzić, że obecnie brakuje jednoznacznych dowodów popierających stosowanie IVIg w leczeniu chorób

wywołanych przez koronawirusy, takie jak SARS-CoV, SARS-CoV-2 i MERS-CoV (*Middle East respiratory syndrome coronavirus* — koronawirus bliskowschodniego zespołu niewydolności oddechowej).

Z kolei immunoglobulina specyficzna otrzymana z osocza dawców z wysokim mianem przeciwciał w stosunku do określonych czynników zakaźnych była z powodzeniem stosowana w leczeniu wielu infekcji, spowodowanych np. przez wirus cytomegalii (CMV, *cytomegalovirus*) lub wirus grypy (H1N1). Zaletą immunoglobuliny specyficznej jest możliwość jej otrzymywania z osocza dawców seropozytywnych w stosunku do specyficznego czynnika zakaźnego, w którym stwierdzono wystarczające do neutralizacji czynnika zakaźnego miano przeciwciał neutralizujących [17].

Skuteczność specyficznych immunoglobulin potwierdzono także podczas leczenia zakażeń spowodowanych innymi koronawirusami (SARS i MERS) [18]. W publikacjach na temat leczenia postępujących zakażeń SARS-CoV-2 potwierdzono szybszą poprawę parametrów klinicznych oraz znacząco niższą śmiertelność u chorych, którzy otrzymali osocze od ozdrowieńców [19]. Analiza badań prospektywnych z 2009 roku potwierdziła skuteczność osocza (o mianie $\geq 1:160$) pobranego od osób po przechorowaniu grypy wywołanej przez wirusa typu A (H1N1) i przetoczonego pacjentom z ciężkim zakażeniem H1N1 [20]. W jednym z badań porównywano także skuteczność immunoglobuliny otrzymanej z osocza pobranego od osób, które przebyły ciężkie zakażenie wirusem H1N1. U pacjentów tych stwierdzono zmniejszenie miana wirusa i wydłużenie czasu przeżycia. Badanie to wykazało przewagę immunoglobulin specyficznych nad IVIg [21].

Zastosowanie immunizacji biernej osoczem ozdrowieńców w leczeniu zakażeń wirusowych

Osocze od osób po przebytych infekcjach wirusowych (CP, *convalescent plasma*) jest wykorzystywane do celów klinicznych od końca XIX wieku. Skuteczne próby terapii osoczem ozdrowieńców podjęto podczas pandemii grypy hiszpanki w 1919 roku [22–24].

Osocze od ozdrowieńców stosowano m.in. w leczeniu odrzy, świnki, ospy wietrznej, infekcji CMV czy parwowirusem B19. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) rekomendowała także użycie osocza ozdrowieńców podczas epidemii gorączki krwotocznej wywołanej

zakażeniem wirusem Ebola [25]. W 2009 roku podczas pandemii grypy AH1N1 zaobserwowano znaczące obniżenie śmiertelności w grupie poddanej terapii osoczem ozdrowieńców w porównaniu z grupą kontrolną (20,0% vs. 54,8%; $p = 0,01$) [20]. Również w przypadku zastosowania osocza w leczeniu MERS oraz SARS zaobserwowano lepsze efekty terapeutyczne w porównaniu z grupą kontrolną [26, 27].

Na podstawie doniesień literaturowych można stwierdzić, że terapia osoczem ozdrowieńców w większości przypadków jest skuteczna i dobrze tolerowana. Rzadko obserwowane są poważne reakcje niepożądane. Szczególnie w przypadku zastosowania osocza ozdrowieńców w leczeniu różnych infekcji wirusowych można stwierdzić, że takie postępowanie zmniejsza śmiertelność, obniża wiremie, a w konsekwencji skraca czas hospitalizacji i przyspiesza rekonwalescencję chorych.

Za efekt leczniczy osocza ozdrowieńców odpowiadają przeciwciała neutralizujące, przy czym kluczowe jest ich odpowiednio wysokie miano. Za metodę referencyjną oznaczania miana przeciwciał neutralizujących uważa się wirusowe testy neutralizacji (VNT, *virus neutralisation test*). Klasyczny VNT polega na przygotowaniu hodowli komórek wrażliwych na zakażenie danym wirusem. Następnie przygotowuje się serię rozcieńczeń testowanej surowicy (lub roztworu zawierającego przeciwciała), miesza się ją z zawiesiną zawierającą określoną ilość cząstek zakaźnych wirusa i dodaje tak przygotowaną mieszaninę do założonej wcześniej hodowli. Po okresie inkubacji wynik otrzymuje się na podstawie zbadania każdej studzienki pod kątem obecności infekcji wirusowej, a właściwie dokonania oceny, czy i w jakim rozcieńczeniu surowicy infekcja wirusowa zostaje zahamowana. W przypadku niektórych wirusów przeprowadza się ocenę mikroskopową efektu cytopatycznego, który może obejmować zmianę morfologiczną zakażonych komórek lub ich lizę i pojawienie się w tym miejscu pustych przestrzeni, tzw. lysin (plaque). Ostateczny wynik badania, wyrażany jako miano przeciwciał neutralizujących w badanej próbce, oznacza ostatecznie rozcieńczenie surowicy skutecznie neutralizujące zakażoną hodowlę w odniesieniu do kontroli [28].

Testy neutralizacji są badaniami wysoce specjalistycznymi, pracochłonnymi, wymagającymi odpowiedniej klasy pomieszczeń laboratoryjnych. Są trudne do wystandaryzowania i wrażliwe na dojrzałość i typ komórek. Wykonuje się je tylko w nielicznych ośrodkach. Rutynowo do określenia przydatności osocza dawców do celów biernej im-

munizacji stosuje się testy serologiczne. W przypadku wirusa SARS-CoV-2 najlepiej skorelowane z mianem przeciwciał neutralizujących są testy oparte na antygenach białka kolca S1 czy domeny wiążącej receptor (RBD, *receptor-binding domain*).

Wiadomo już, że wiremie osiąga zwykle najwyższy poziom w ciągu 1. tygodnia trwania infekcji, natomiast pierwotna odpowiedź immunologiczna jest rozwijana pod koniec 2. tygodnia trwania zakażenia. Na tej podstawie można wnioskować, że zastosowanie osocza we wczesnym stadium choroby może pozwolić osiągnąć lepsze efekty terapeutyczne [29].

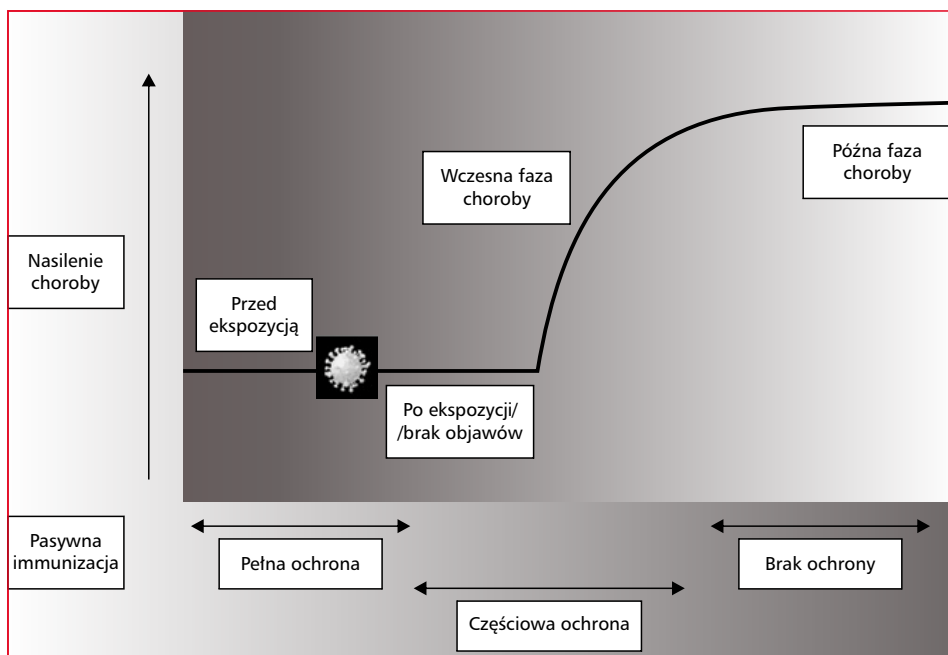
Efektywność biernej immunizacji zmniejsza się w miarę progresji zakażenia. Pełną ochronę przed wystąpieniem choroby objawowej można uzyskać poprzez profilaktyczne podanie immunoglobuliny przed ekspozycją na czynnik zakaźny. Bierna immunizacja może być wysoce skuteczna, gdy jest zastosowana bezpośrednio po ekspozycji, jeszcze przed wystąpieniem objawów. Terapia immunoglobulinami jest mało skuteczna, gdy zostaje zastosowana po wystąpieniu objawów choroby. Przy zastosowaniu terapii w późnym stadium choroby występują niewielkie korzyści kliniczne lub nie ma ich wcale (ryc. 1).

Bierna immunizacja a COVID-19

Pod koniec grudnia 2019 roku w mieście Wuhan (Chiny, prowincja Hubei) wykryto przypadek zapalenia płuc spowodowanego infekcją nieznanym dotąd koronawirusem, nazywanym początkowo 2019-nCoV. W lutym 2020 roku WHO zatwierdziła oficjalną nazwę wirusa — SARS-CoV-2 — i nazwę wywoływanej przez niego choroby — choroba koronawirusowa 2019 (COVID-1, *coronavirus disease 2019*). Koronawirusy są znanymi czynnikami zakaźnymi, które podzielono na cztery rodzaje: α - i β -koronawirusy (zakaźne dla ssaków) oraz γ - i δ -koronawirusy (wywołujące choroby u ptaków). Wirus SARS-CoV-2 (należący do β -koronawirusów) jest siódmym spośród poznanych koronawirusów mogących zainfekować człowieka. Swoją nazwę zawdzięcza wysokiemu podobieństwu do ludzkiego wirusa SARS (82%) oraz do występującego u nietoperzy SARS-like-CoVZXC21.

Raport WHO z dnia 18 kwietnia 2021 roku podaje, że na całym świecie od początku trwania pandemii odnotowano 140 322 903 przypadki COVID-19. W wyniku choroby wywołanej SARS-CoV-2 zmarły 3 003 794 osoby.

Pandemia COVID-19 spowodowana rozprzestrzenieniem się SARS-CoV-2 stanowi zarówno



Rycina 1. Efektywność biernej immunizacji w zależności od fazy zakażenia, w której zostanie zastosowana

bezpрецедensowe wyzwanie dla klinicystów, jak i obciążenie systemu ochrony zdrowia ze względu na wysoki wskaźnik zakaźności i śmiertelności. Biorąc pod uwagę szybkie i katastrofalne rozprzestrzenianie się COVID-19, należało prześledzić istniejące opcje terapeutyczne mogące pomóc w zwalczaniu zakażenia SARS-CoV-2 do czasu pojawienia się szczepionki lub innego skutecznego leku. Duże nadzieje wiązano z osoczem pobranym od osób po przechorowaniu COVID-19 oraz z preparatami immunoglobulin.

W toku są liczne badania z randomizacją mające określić skuteczność terapii osoczem ozdrowieńców w przypadku zakażenia SARS-CoV-2 [30].

Amerykańska organizacja rządowa Narodowe Instytuty Zdrowia (NIH, *National Institutes of Health*), zajmująca się badaniami biomedycznymi i związanymi ze zdrowiem, w ostatnich rekomendacjach z dnia 9 października 2020 roku podaje, że pomimo niewystarczających jeszcze danych z dobrze kontrolowanych badań z randomizacją, wykazujących efektywność i bezpieczeństwo stosowania osocza ozdrowieńców w leczeniu COVID-19, już ponad 70 000 pacjentów w Stanach Zjednoczonych zostało poddanych takiej terapii w ramach programu kliniki Mayo — *Mayo Clinic's Expanded Access Program (EAP)*.

Amerykańska Agencja Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*) oraz *Mayo Clinic* przeprowadziły retrospektywne, pośrednie badania oceny skuteczności terapii osoczem

ozdrowieńców przy wykorzystaniu danych *Mayo Clinic EAP*, z których wynika, że u pacjentów, którzy otrzymali jednostki osocza z wyższymi mianami przeciwciał neutralizujących SARS-CoV-2, zaobserwowano lepsze efekty terapeutyczne niż u tych, którzy otrzymali osocze o niższych mianach przeciwciał. Potwierdziły to wyniki badaczy z *Mayo Clinic*, którzy wykazali mniejszą śmiertelność (22,3%) wśród pacjentów z grupy, która otrzymała osocze ozdrowieńców zawierające wysokie miano przeciwciał anti-SARS-CoV-2, w porównaniu z grupą, która otrzymała osocze o średnim i niskim mianie przeciwciał (odpowiednio 27,4% oraz 29,6%) [31]. Szczególnie dobrą odpowiedź na leczenie zaobserwowano w przypadku podania osocza w ciągu 72 godzin od rozpoznania COVID-19 [32]. Działania niepożądane w przypadku zastosowania osocza ozdrowieńców u chorych na COVID-19 są rzadkie i podobne jak w przypadku podania osocza z innych wskazań.

Opierając się na wszystkich dostępnych obecnie dowodach naukowych, można wnioskować, że prawdopodobne korzyści ze stosowania osocza ozdrowieńców w terapii COVID-19 przewyższają znane i potencjalne zagrożenia.

W celu zminimalizowania działań niepożądanych po podaniu osocza ozdrowieńców kilka ośrodków na świecie podjęło próbę wytworzenia hiperimmunizowanej globuliny anti-SARS-CoV-2 (*hIVIg, hyperimmune intravenous immunoglobulin*) [33]. Koncentrat immunoglobuliny pozwala na podanie

przeciwciał neutralizujących w mniejszej objętości, co powinno się przyczynić do zmniejszenia liczby reakcji niepożądanych związanych z przetoczeniem osocza. Stosuje się różne metody uzyskania koncentratu immunoglobuliny. Naukowcy pod kierownictwem Vandeburga zastosowali metodę chromatograficzną, dzięki której w koncentracie udało się osiągnąć około 10-krotnie wyższe stężenie specyficznych przeciwciał anty-SARS-CoV-2 w porównaniu ze stężeniem tych przeciwciał w puli osocza ozdrowieńców. Jednocześnie aktywność neutralizująca przeciwciał jest około 3-krotnie wyższa w produkcie końcowym w stosunku do puli osocza [34]. Oznacza to, że pacjent poddany terapii hIVIg otrzyma przeciwciała o wyższej aktywności neutralizującej w dawce stanowiącej ekwiwalent osocza ozdrowieńców. Końcowy produkt zawiera 100% IgG. Natomiast niepożądane białka, takie jak IgM, IgA, przeciwciała anty-A, anty-B, anty-D, zostały praktycznie wyeliminowane. Przeciwciała klasy IgM odpowiadające za wewnątrznaczyniową aktywność hemolityczną przeciwciał anty-A i anty-B zostały usunięte, co zapobiega hemolizie wewnątrznaczyniowej [35]. W związku z tym, w przeciwieństwie do stosowania osocza, nie jest konieczny dobór dawców zgodnych pod względem układu AB0.

Usunięcie IgA zapewnia korzyść terapeutyczną związaną ze stosowaniem hIVIg w porównaniu z osoczem ozdrowieńców u pacjentów z niedoborem IgA, którzy mogli być wcześniej leczeni produktami krwiopochodnymi i wytworzyli przeciwciała przeciwko IgA.

Potencjalną przewagę hIVIg nad bezpośrednim podawaniem osocza ozdrowieńców stanowi różnorodność przeciwciał uzyskanych z puli osocza ozdrowieńców, która może zapewnić szerszy zakres aktywności przeciwwirusowej [36]. Taka różnorodność może być istotna w związku z faktem pojawiania się nowych wariantów wirusa SARS-CoV-2. Zróżnicowanie przeciwciał może zapewnić szerszy zakres aktywności przeciwwirusowej poprzez atakowanie różnych epitopów wirusa i wykorzystywanie różnych mechanizmów komórkowych [32].

Należy się zatem spodziewać, że zastosowanie hIVIg może się okazać bardziej skuteczne niż zastosowanie świeżo mrożonego osocza, pobranego od osób po przechorowaniu COVID-19.

W trakcie badań klinicznych jest preparat otrzymany podczas prac prowadzonych pod kierunkiem Vandeburga. Badania te zapewne dostarczą wkrótce istotnych informacji na temat skuteczności i bezpieczeństwa stosowania hIVIg anty SARS-CoV-2 [37].

Należy wspomnieć, że prace polskich naukowców pod kierownictwem profesora Tomaszewicza, realizowane przy udziale firmy BIOMED-LUBLIN i Instytutu Hematologii i Transfuzjologii (projekt nr 2020/ABM/COVID19/0036), dotyczące stworzenia koncentratu immunoglobuliny anty-SARS-CoV-2, także są w fazie badań klinicznych.

Przyszłość immunizacji biernej

Znaczny postęp w zakresie technologii MAb i coraz większe uznanie dla roli przeciwciał w zwalczaniu chorób zakaźnych spowodowały, że nowe terapie oparte na immunizacji biernej będą prawdopodobnie nadal się rozwijać. Jednocześnie pojawiająca się coraz częściej antybiotykooporność istotnych klinicznie bakterii, takich m.in. jak *Staphylococcus aureus* lub *Salmonella typhi*, jest bardzo alarmująca, co dodatkowo motywuje do prowadzenia badań nad rozwojem terapii opartych na przeciwciałach. Jedno z ograniczeń biernej immunizacji stanowi krótki okres półtrwania przeciwciał *in vivo*, który często zapewnia tylko przejściową ochronę i wymaga powtórzenia terapii. Duże nadzieje budzą nowe technologie, które wydłużają okres półtrwania MAb. Jednym z takich przykładów jest mutacja regionu Fc MAb anty-RSV w celu zwiększenia jego wiązania z receptorem Fc, co skutkuje wzrostem farmakokinetyki przeciwciał w surowicy u ludzi z typowego 19–34-dniowego okresu półtrwania do 100-dniowego, przy jednoczesnym zachowaniu aktywności neutralizującej swoistej dla wirusa. Wprawdzie immunizacja bierna może być wystarczająca do ochrony lub leczenia choroby w fazie ostrej lub podczas jej remisji, jednak wydaje się, że immunizacja aktywna poprzez odpowiednio „zaprojektowaną” szczepionkę nadal jest potrzebna w celu utrzymania długoterminowego poziomu odporności ochronnej. Należy podkreślić, że skuteczne metody immunizacji biernej mogą stanowić bazę do opracowywania nowych i ulepszonych szczepionek.

Piśmiennictwo

1. Niewiesk S. Maternal antibodies: clinical significance, mechanism of interference with immune responses, and possible vaccination strategies. *Front Immunol.* 2014; 5: 446, doi: [10.3389/fimmu.2014.00446](https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00446), indexed in Pubmed: 25278941.
2. Fischer A. Severe combined immunodeficiencies (SCID). *Clin Exp Immunol.* 2000; 122(2): 143–149, doi: [10.1046/j.1365-2249.2000.01359.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01359.x), indexed in Pubmed: 11091267.
3. Lederman HM, Winkelstein JA. X-linked agammaglobulinemia: an analysis of 96 patients. *Medicine (Baltimore).* 1985; 64(3): 145–156, indexed in Pubmed: 2581110.
4. Slifka M, Amanna I. Passive Immunization. *Plotkin's Vaccines.* 2018: 84–95.e10, doi: [10.1016/b978-0-323-35761-6.00008-0](https://doi.org/10.1016/b978-0-323-35761-6.00008-0).

5. Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 2009; 16(49): 1113–1114, doi: [10.1055/s-0029-1207589](https://doi.org/10.1055/s-0029-1207589).
6. Winau F, Winau R. Emil von Behring and serum therapy. *Microbes Infect*. 2002; 4(2): 185–188, doi: [10.1016/s1286-4579\(01\)01526-x](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(01)01526-x), indexed in Pubmed: 11880051.
7. Marano G, Vaglio S, Pupella S, et al. Convalescent plasma: new evidence for an old therapeutic tool? *Blood Transfus*. 2016; 14(2): 152–157, doi: [10.2450/2015.0131-15](https://doi.org/10.2450/2015.0131-15), indexed in Pubmed: 26674811.
8. Charakterystyka produktu leczniczego Gamma anty-HBs 200, „BIOMED-LUBLIN” Wytwórnia Surowic i Szczepionek Spółka Akcyjna.
9. Cohn EJ, Strong LE. Preparation and properties of serum and plasma proteins; a system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J Am Chem Soc*. 1946; 68: 459–475, doi: [10.1021/ja01207a034](https://doi.org/10.1021/ja01207a034), indexed in Pubmed: 21015743.
10. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. 1985; 228(4705): 1315–1317, doi: [10.1126/science.4001944](https://doi.org/10.1126/science.4001944), indexed in Pubmed: 4001944.
11. Alkan SS. Monoclonal antibodies: the story of a discovery that revolutionized science and medicine. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4(2): 153–156, doi: [10.1038/nri1265](https://doi.org/10.1038/nri1265), indexed in Pubmed: 15040588.
12. Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, et al. scFv antibody: principles and clinical application. *Clin Dev Immunol*. 2012; 2012: 980250, doi: [10.1155/2012/980250](https://doi.org/10.1155/2012/980250), indexed in Pubmed: 22474489.
13. Steinwand M, Droste P, Frenzel A, et al. The influence of antibody fragment format on phage display based affinity maturation of IgG. *MAbs*. 2014; 6(1): 204–218, doi: [10.4161/mabs.27227](https://doi.org/10.4161/mabs.27227), indexed in Pubmed: 24262918.
14. Lu RM, Hwang YC, Liu IJ, et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci*. 2020; 27(1): 1, doi: [10.1186/s12929-019-0592-z](https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z), indexed in Pubmed: 31894001.
15. Marasco WA, Sui J. The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics. *Nat Biotechnol*. 2007; 25(12): 1421–1434, doi: [10.1038/nbt1363](https://doi.org/10.1038/nbt1363), indexed in Pubmed: 18066039.
16. Cao W, Liu X, Bai T, et al. High-dose intravenous immunoglobulin as a therapeutic option for deteriorating patients with coronavirus disease 2019. *Open Forum Infect Dis*. 2020; 7(3): ofaa102, doi: [10.1093/ofid/ofaa102](https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa102), indexed in Pubmed: 32258207.
17. Jawhara S. Could intravenous immunoglobulin collected from recovered coronavirus patients protect against COVID-19 and strengthen the immune system of new patients? *Int J Mol Sci*. 2020; 21(7), doi: [10.3390/ijms21072272](https://doi.org/10.3390/ijms21072272), indexed in Pubmed: 32218340.
18. Who Mers-Cov Research Group. State of knowledge and data gaps of middle east respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) in Humans. *PLoS Curr*. 2013; 5, doi: [10.1371/currents.outbreaks.0bf719e352e7478f8ad85fa30127ddb8](https://doi.org/10.1371/currents.outbreaks.0bf719e352e7478f8ad85fa30127ddb8), indexed in Pubmed: 24270606.
19. Shen C, Wang Z, Zhao F, et al. Treatment of 5 critically ill patients with COVID-19 with convalescent plasma. *JAMA*. 2020; 323(16): 1582–1589, doi: [10.1001/jama.2020.4783](https://doi.org/10.1001/jama.2020.4783), indexed in Pubmed: 32219428.
20. Hung IFN, To KKw, Lee CK, et al. Convalescent plasma treatment reduced mortality in patients with severe pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus infection. *Clin Infect Dis*. 2011; 52(4): 447–456, doi: [10.1093/cid/ciq106](https://doi.org/10.1093/cid/ciq106), indexed in Pubmed: 21248066.
21. Luke TC, Casadevall A, Watowich SJ, et al. Hark back: passive immunotherapy for influenza and other serious infections. *Crit Care Med*. 2010; 38(4 Suppl): e66–e73, doi: [10.1097/CCM.0b013e3181d44c1e](https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181d44c1e), indexed in Pubmed: 20154602.
22. Gould EW. Human serum in the treatment of influenza bronchopneumonia *N Y Med J*. 1919; 109: 666–667.
23. Holst J. Convalescent serum in the treatment of influenza *Nor Mag Laegevidenskaben*. 1919; 80: 31–561.
24. Huff-Hewitt W. Human serum in influenza. *Br Med J*. 1919; 1: 575.
25. Griensven Jv, Edwards T, Lamballerie Xde, et al. Evaluation of convalescent plasma for Ebola virus disease in Guinea. *N Engl J Med*. 2016; 374(1): 33–42, doi: [10.1056/nejmoa1511812](https://doi.org/10.1056/nejmoa1511812), indexed in Pubmed: 26735992.
26. Who Mers-Cov Research Group. State of Knowledge and Data Gaps of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) in Humans. *PLoS Curr*. 2013; 5, doi: [10.1371/currents.outbreaks.0bf719e352e7478f8ad85fa30127ddb8](https://doi.org/10.1371/currents.outbreaks.0bf719e352e7478f8ad85fa30127ddb8), indexed in Pubmed: 24270606.
27. Wong VWS, Dai D, Wu AKL, et al. Treatment of severe acute respiratory syndrome with convalescent plasma. *Hong Kong Med J*. 2003; 9(3): 199–201, indexed in Pubmed: 12777656.
28. <https://microbenotes.com/neutralization-test-introduction-and-types>.
29. Cheng Y, Wong R, Soo YOY, et al. Use of convalescent plasma therapy in SARS patients in Hong Kong. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005; 24(1): 44–46, doi: [10.1007/s10096-004-1271-9](https://doi.org/10.1007/s10096-004-1271-9), indexed in Pubmed: 15616839.
30. Piechotta V, Iannizzi C, Chai KLI, et al. Convalescent plasma or hyperimmune immunoglobulin for people with COVID-19: a rapid review. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020; 5: CD013600, doi: [10.1002/14651858.CD013600](https://doi.org/10.1002/14651858.CD013600), indexed in Pubmed: 32406927.
31. Joyner MJ, Carter RE, Senefeld JW, et al. Convalescent plasma antibody levels and the risk of death from Covid-19. *N Engl J Med*. 2021; 384(11): 1015–1027, doi: [10.1056/NEJMoa2031893](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2031893), indexed in Pubmed: 33523609.
32. Food and Drug Administration. EUA 26382: emergency use authorization (EUA) request; 2020.
33. <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-clinical-trial-testing-hyperimmune-intravenous-immunoglobulin-plus-remdesivir-treat-covid-19-begins>.
34. Vandeberg P, Cruz M, Diez JM. Production of anti-SARS-CoV-2 hyperimmune globulin from convalescent plasma *bioRxiv* 2020. 11; 18: 388991, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.11.18.388991>.
35. Flegel WA. Pathogenesis and mechanisms of antibody-mediated hemolysis. *Transfusion*. 2015; 55 Suppl 2: S47–S58, doi: [10.1111/trf.13147](https://doi.org/10.1111/trf.13147), indexed in Pubmed: 26174897.
36. Liu L, Wang P, Nair M, et al. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature*. 2020; 584(7821): 450–456, doi: [10.1038/s41586-020-2571-7](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2571-7), indexed in Pubmed: 32698192.
37. Inpatient treatment with anti-coronavirus immunoglobulin (ITAC) [monograph on the internet]. *clinicaltrials.gov*; 2020. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04546581>.

Passive immunization in the combat against infectious diseases (COVID-19 included)

Joanna Lasocka¹, Artur Bielawski², Elżbieta Lachert¹

¹Institute of Hematology and Transfusion Medicine in Warsaw

²„BIOMED-LUBLIN” Factory of Serum and Vaccines, S.A.

Summary

Passive immunization (passive immunity, passive immunotherapy) consists in the transfer of specific antibodies to an unprotected individual with the purpose of protecting from infection or treatment of the disease. Passive immunization is acquired either naturally (maternal antibodies cross the placenta to reach the fetus) or artificially when the patient is transfused with high-titer antibodies of human or animal origin or developed by genetic engineering (monoclonal antibodies, MAb). The beginnings of passive immunization date back to the end of the XIX century when Emil Adolf von Behring was the first to use antibodies of animal origin in the treatment of diphtheria and tetanus. In Poland, the Lublin Factory of Serum and Vaccines established in 1951 launched an industrial-scale production of immune sera against diphtheria, scarlet fever, measles, meningitis and poliomyelitis (Heine Medin disease).

Passive immunization is relied on for prevention of infection, for treatment of immunodeficiency disorders (including hypogammaglobulinemia), acute infections and poisoning. Immunity derived from passive immunization lasts for a few weeks to about four months.

Since December 2019, the ongoing SARS-CoV-2 pandemic has initiated numerous randomized trials focused on determining the effectiveness of convalescent plasma therapy for COVID-19 infected patients. In order to minimize the occurrence of adverse reactions following the administration of convalescent plasma, attempts have been made to produce hyperimmune anti-SARS-CoV-2 globulin (hIVIG). It is also worthwhile to mention that there are ongoing clinical trials on anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin concentrate developed by Polish researchers under the supervision of Professor Tomasiewicz and in cooperation with the Institute of Hematology and Transfusion Medicine in Warsaw as well as BIOMED-LUBLIN (Project No. 2020/ABM/COVID19/0036).

Key words: passive immunization, convalescent plasma, SARS-CoV-2, COVID-19, anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin

J. Transf. Med. 2021; 14: 50–57

Correspondence address: dr n. med. Joanna Lasocka, Institute of Hematology and Transfusion Medicine, Indiry Gandhi Street 14, 02–776 Warszawa, phone (22) 34 96 386, e-mail: jlasocka@ihit.waw.pl

Translation: mgr Krystyna Dudziak

This article is available in open access under Creative Common Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) license, allowing to download articles and share them with others as long as they credit the authors and the publisher, but without permission to change them in any way or use them commercially.

Passive immunization

Passive immunization, passive immunity or passive immunotherapy are all terms that refer to prophylactic or therapeutic transfer of specific antibodies to an unprotected individual.

Passive immunization is either:

- natural — when maternal antibodies cross the placenta to reach the fetus;
- artificially acquired — when high-titer antibodies (human or animal) specific to an infectious agent or toxin are given as a medication to induce immunity in a non-immune patient.

Passive immunization serves to reduce the risk of contracting an infectious disease or to relieve disease symptoms. Passive immunization is performed in patients who are unable to synthesize antibodies or were exposed to a disease to which they are not immune.

Natural passive immunization

A natural form of passive immunotherapy is cross-placental transfer of maternal IgG immunoglobulins to fetal blood. The crossing is mediated by Fc IgG receptors present on the surface of trophoblast cells. Breast milk provides IgA antibodies to the suckling infant which mainly affect mucous membranes of the digestive tract [1]. IgM antibodies already appear in the fetal period, while the production of IgG antibodies begins shortly after birth to reach about 60% of the titer detected in adults after 12 months. With time, maternal antibody titer gradually decreases to disappear completely when the newborn is about 9 months old. IgG antibody titer is at its lowest when the newborn is 2–3 months old. Maternal antibodies effectively protect newborns and infants against most infectious diseases. The most striking example are cases of children with severe combined immunodeficiency (SCID) presenting clinical symptoms usually 6 months after birth i.e. when maternal antibodies are at the lowest [2, 3].

Another proof of the relation between maternal immunity and infant immunity is the similar prevalence of antibodies in infants below 1 month and that observed in 20–40 year old adults who represent the main age group of the mothers [4].

Artificial passive immunization

Short-term artificial passive immunity is acquired through administration of human or animal plasma antibodies, monoclonal antibodies (MAb), human immunoglobulin for intravenous (IVIG) or intramuscular (IMIG) use, specific im-

munoglobulins from immunized donors or as result of convalescent plasma therapy (CPT).

Passive immunization provides protection against infection and it is used to treat immunodeficiency (hypogammaglobulinemia), acute infections and poisoning. Effects of passive immunization last from several weeks to approximately four months.

History of passive immunization

The first successful attempts at applying passive immunization in the treatment of diphtheria and tetanus (in animal studies) were published in 1890 in *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, German Medical Journal [5]. The method was fairly quickly modified and adapted to clinical use. As early as the mid-1890s, diphtheria-specific antitoxin was successfully used in hospital setting to reduce mortality rate during diphtheria outbreaks. In 1901, Emil Adolf von Behring was awarded the first Nobel Prize in Medicine for applying serotherapy in the fight against diphtheria. The Nobel Committee emphasized the importance of von Behring's work by adding the following words to the official statement: "with the work (of von Behring) a new pathway in medicine has been opened, and physicians were given an important tool/weapon in their combat against disease and death".

In Germany alone immunotherapy (diphtheria specific agents) helped to save about 45 000 patients annually. In the 1890s, the mortality rate for hospitalized diphtheria patients ranged from 47% to 60% and in the pre-antibiotic era the study outcome of Emil von Behring and his collaborator Shibasaburo Kitasato was the only hope for diphtheria patients.

Behring and Kitasato conducted similar experiments with *Clostridium tetani*. Rabbit blood immunized with *Clostridium tetani* gave mice complete protection against typically lethal doses of virulent bacteria and botulinum toxin. The study outcome gave rise to the production of specific anti-tetanus immunoglobulin [5].

In the first years of passive immunotherapy, due to the fact that it was impossible to obtain human antibodies on a large scale, attempts were made to obtain them from animals. Anti diphtheria antibodies for example were obtained from immunized cows [6]. Although the technology of obtaining specific immunoglobulins has now been significantly modified, some specific immunoglobulins are still of animal origin, e.g. Antivenin, by MERC & Co — an immunoglobulin of equine origin that neutralizes neurotoxin of the poisonous black widow spider (*Latrodectus mactans*), botulism

antitoxin — bivalent) types A and B (equine), Sano Pasteur used for prophylactic and therapeutic management of botulism.

The classic approach to antibody production consists in immunizing animals with a specific antigen and isolating the antibodies from the host's blood. Despite advanced engineering technology proteins of animal origin may induce numerous adverse reactions. Passive immunotherapy based on animal antibodies should therefore be applied only under strict medical supervision.

Passive immunization was used extensively for treatment of diseases such as scarlet fever and whooping cough from the 20s to the 70s of the XX century [7].

Medicinal products containing human immunoglobulin are used, among others, for treatment of primary immunodeficiency with impaired antibody production, diphtheria, tetanus, hepatitis A and B (HAV, HBV), rabies, measles, smallpox, primary immune thrombocytopenia, Kawasaki syndrome, lower respiratory tract infection and in prevention of fetomaternal incompatibility and hemolytic disease of the fetus and newborn.

Prophylactic administration of antibodies against hepatitis B has largely been replaced by vaccination; however, immunoprophylaxis of hepatitis B infection is still indicated in cases of accidental exposure of unprotected individuals (incomplete or unknown immunization status) such as high risk hospitalized patients, sexual partners of individuals with acute hepatitis B infection or healthcare workers exposed to hepatitis B infected blood or other body fluids following percutaneous needle injury or cut. Immunoprophylaxis of hepatitis B infection is also applied to infants born to HBsAg positive mothers [8].

Human immunoglobulins reduce the symptoms of some systemic inflammatory and autoimmune diseases or induce remission of disease.

The method of plasma fractionation into proteins to obtain blood-derived medicinal products was developed by Cohn and his collaborators in the 1940's and is used even now in modified form [9]. Source material for fractionation is fresh frozen plasma (FFP) collected at 23 Polish Blood Transfusion Centers (CKiK). Plasma for fractionation is subjected to rigorous procedures such as screening for HBV, HCV and HIV infection markers, to reduce the risk of transmitting infection. Nevertheless the risk cannot be completely eliminated and therefore, since the 1980s, both plasma and medicinal products from pooled plasma are subjected to pathogen inactivation.

Plasma used for manufacture of medicinal products which contain human immunoglobulins differs with regard to the titer of specific antibodies. The choice of plasma for a specific disease is determined by the optimal therapeutic effect to be achieved. One such medicinal product that has been taken into account is immunoglobulin for intravenous use (IVIG).

With advancement in technology and particularly in monoclonal antibody production techniques new methods were developed which largely reduced the demand for antibodies of animal origin.

An alternative approach to antibody production is the antibody *Phage Display* technology based on genetic engineering of bacteriophages and generating libraries comprising myriads of variants of recombinant proteins displayed on their surface. Phage libraries allow to isolate functional antibody fragments of virtually any specificity. The method was first described by Georg Smith in 1985 [10, 11].

Phage libraries are based on single chain fragment variables (scFv) — the smallest functional antibody fragments responsible for interaction with the antigen.

Antibody libraries are generated by preparing template cDNA from B cells of non-immunized human donors and amplification of V_H and V_L antibody fragments or antibody construction based on random insertion of amino acid mutations in complementary determining regions (CDRs). A pool of various sequence- antibody variants is thus generated which are displayed on the surface of the phages. Screening of phage libraries allows to select (from phage pools) the specific phage that interacts with the selected antigen [12].

Antibody variants acquired through Phage Display technique may additionally be subjected to the affinity maturation process. This technique mimics the natural process of antibody production with increasing affinity for an antigen. A similar effect is attained in laboratory conditions/in vitro by developing second-generation libraries comprising variants of higher affinity to antigen [13].

The antibody fragments acquired as result of selection are screened by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and then sequenced to identify the most common variable regions used by the immune system to elicit antibody response. Antibody fragments produced by bacterial colonies are typically purified by affinity chromatography. Through analysis of selected antibodies it is possible to determine the precise constant kinetics of the antigen-antibody binding.

In the same way scFv format antibodies are produced against haptens, proteins, carbohydrates, receptors, tumor antigens or viruses. They find application in therapy or in a variety of diagnostic kits.

Antibodies for therapeutic/clinical use may also be linked with cytostatic drugs (antibody-drug conjugates, ADCP) or radioisotopes for more effective delivery to target tissues. Phage Display technology is successfully used by many pharmaceutical companies in their scientific quest for biological drugs. Examples of commercially available human therapeutic antibodies obtained with Phage Display technique are: Humira (adalimumab) — an antibody directed against tumor necrosis factor α (TNF α) which — among others — is applied in the management of rheumatoid arthritis and Benlysta (belimumab) — human IgG1 directed against the B lymphocyte stimulator (BLyS), a soluble ligand of the TNF family cytokines, which are used in the treatment of systemic lupus erythematosus. Under clinical trials are other antibodies from phage libraries [14].

The validity and effectiveness of Phage Display technique for obtaining high-specificity human antibodies of therapeutic potential have been confirmed. Other technologies have also been developed based on chimeric monoclonal antibodies in which the mouse antibody is “humanized”. The effect is achieved by replacing murine immunoglobulin genes with human immunoglobulin genes [15].

Passive immunization in prevention of infectious diseases; Polish experience

The significance of passive immunotherapy in the combat against infectious diseases was most striking after World War II when the situation in Poland became dramatic due to military operations, migration of people and troops. Immediate actions to prevent the spread of infectious diseases were required.

In 1944 a group of professors and scientists from university centers of Lviv, Warsaw and Poznań, founded the National Institute of Hygiene (PZH) with the seat in Lublin the main task of which was development, implementation and supervision of activities related to protection of the Polish population against the spread of infectious diseases.

In 1951 the Department for Production of Serum and Vaccines — one of the organizational units of PZH — was transformed into the Lublin Factory of Serum and Vaccines later known as “Biomed” Serum and Vaccine Production Plant PLC in Lublin (“BIOMED-LUBLIN” Wytwórnia Surowic i Szczepionek S.A) which is active until the pre-

sent. It was the first biotech pharmaceutical plant in Poland. The immunopreparations developed and manufactured there were the crucial element of the national prophylactic strategy for years. The plant was also the first in Poland as well as in Central Europe to launch an industrial-scale production of immune sera against diphtheria, meningitis, measles and scarlet fever.

Anti-tetanic, anti-diphtheric, and anti-meningitis sera were prepared from blood of hyperimmunized horses. Measles were treated with human convalescent measles serum.

It would be difficult to overestimate the importance of the above-mentioned sera in the fight against tetanus, diphtheria, scarlet fever, measles or poliomyelitis (Heine Medin disease) in Poland. Currently, the production of immunoglobulins for treatment of the diseases is terminated as the latter are under control.

Immunoglobulin (IVIG) for intravenous use and specific immunoglobulin for COVID-19 therapy

IVIG in the United States was approved for clinical use in 1980 and found effective in prophylaxis of life-threatening infections in patients with primary and secondary immunodeficiencies. IVIG is used in the management of such chronic infections as parvovirus B19.

The current experience with IVIG in the treatment of SARS-CoV-2 infection is rather limited. The rationale for using IVIG in SARS-CoV-2 infection is primarily to modulate inflammation. IVIG has been found to reduce the inflammatory response in severe SARS-CoV-2 infections. Chinese publications report the use of IVIG in severe cases of SARS-CoV-2 infections where normalization of fever and improvement of respiratory symptoms occurred. The results however cannot be considered conclusive as the patients also received antiviral drugs and steroids which may have interfered with the impact of immunoglobulins [16]. It can therefore be concluded that there is currently no clear evidence to support the rationale for use of IVIG in the management of diseases such as SARS-CoV, SARS-CoV-2 and MERS.

On the other hand, specific immunoglobulin obtained from donor plasma with high antibody titer to certain infectious agents has been successfully used in the treatment of numerous infections, caused e.g. by cytomegalovirus (CMV) or influenza virus (H1N1). Specific immunoglobulins have the advantage of being obtained from the plasma of donors seropositive to a specific infectious agent

with antibody titers high enough to neutralize the infectious agent [17].

Effectivity of specific immunoglobulins has also been confirmed in the management of infections caused by other coronaviruses (SARS severe acute respiratory syndrome and MERS Middle East Respiratory Syndrome) [18]. Publications confirmed accelerated improvement of clinical parameters and significantly lower mortality rate for patients treated with convalescent plasma during management of progressive COVID-19 infections [19]. In 2009, prospective analyses confirmed the effectiveness of plasma (titer $\geq 1:160$) from H1N1 — infected individuals transfused to patients with severe H1N1 infection [20]. One of the studies also demonstrated the advantage of specific immunoglobulins over IVIG; patients were observed to have lower viral load and prolonged survival time following administration of immunoglobulin obtained from plasma of severe H1N1 survivors as compared to therapy with IVIG [21].

Passive immunization with convalescent plasma in the management of viral infections

Plasma collected from individuals with a history of viral infections (convalescent plasma, CP) has been used in clinical setting since the end of the 19th century infections. Successful attempts at CPT were made during the Spanish flu pandemic of 1919 [22–24].

Convalescent plasma was used, among others in the treatment of measles, mumps, chicken pox, cytomegalovirus, and parvovirus B19 infections. The World Health Organization (WHO) also recommended CPT during the Ebola epidemic [25]. In 2009, during the influenza A pandemic caused by the H1N1 subtype, a significant reduction in mortality rate was observed in patients treated with convalescent plasma as compared to control (20.0% vs. 54.8%; $p = 0.01$) [20]. Likewise, CP used in the treatment of MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus) and SARS (severe acute respiratory syndrome) gave better therapeutic results as compared to control [26, 27].

In the literature, CPT is reported to be effective and well tolerated. Serious adverse reactions are infrequent. Convalescent plasma is particularly effective in the treatment of various viral infections as it reduces mortality rate, lowers viremia, accelerates recovery and shortens hospitalization.

Crucial for the therapeutic effect of convalescent plasma are the neutralizing antibodies of su-

fficiently high titer. The Virus Neutralization Test (VNT) is the gold standard for determining the neutralizing antibody titer. The classic test consists in preparation of cell culture susceptible to infection with a specific virus. A series of dilutions of the test serum (or a solution containing antibodies) is then prepared and mixed with the suspension containing a certain amount of infectious virus particles. The mixture is then added to the cell culture. After the incubation period, the result is read from each well for the presence of viral infection; assessment of the dilution at which the viral infection is inhibited. For some viruses, a microscopic evaluation of the cytopathic effect may include morphological change in the infected cells or lysis and appearance of plaques in place of voids. The final result, expressed as the neutralizing antibody titer in the test sample, represents the last dilution of the serum effectively neutralizing the contaminated culture as compared to control [28].

Neutralization tests are highly specialized, labor-intensive and time-consuming tests that require access to laboratories of adequate biosafety level. Difficult to standardize, they are sensitive to cell maturity and type. The number of centers performing such tests is limited. Suitability of donor plasma for passive immunization is routinely determined by serological tests. For SARS-CoV-2, the tests based on the S1 or RBD spike protein antigens are best correlated with the level of neutralizing antibodies.

It is known for a fact that viremia typically peaks during the first week of infection, while the primary immune response develops at the end of the second week. Hence, applying plasma in the early stage of infection may bring better therapeutic effects [29].

The effectivity of passive immunization decreases as the infection progresses. Complete protection against symptoms of the disease is attained through application of immunoglobulin prior to exposure. Passive immunization is highly effective when administered immediately after exposure, before the symptoms develop. Immunoglobulin therapy is less effective when applied after the onset of disease symptoms. Little or no clinical benefit is observed with immunoglobulin therapy applied in the late stage of the disease (Fig. 1).

Passive immunization vs. COVID-19

At the end of December 2019 pneumonia cases were detected in the city of Wuhan (China, Hubei province) attributed to an unknown coronavirus,

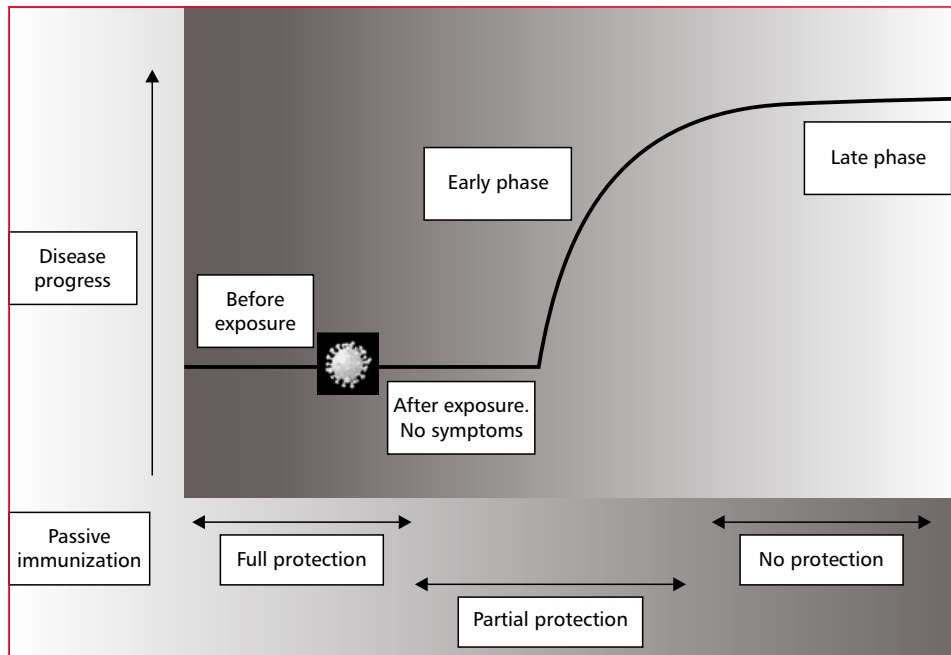


Figure 1. Effectivity of passive immunization with regard to disease phase

initially called 2019-nCoV. In February 2020, WHO approved the official name of the virus — SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) and of the disease — COVID-19 (*Coronavirus Disease 2019*). Coronaviruses are infectious agents classified into four types: α - and β -coronaviruses (infectious to mammals) and γ - and δ -coronaviruses (responsible for bird diseases). The SARS-CoV-2 virus (a β -coronavirus) is the seventh coronavirus known to infect humans and it owes the name to similarity to the human SARS virus (82%) and to the SARS-like-CoVZXC21 in bats.

According to WHO estimates of April 18nd 2021, 140 322 903 COVID-19 cases have been reported worldwide since the beginning of the pandemic and there were 3 003 794 fatal cases ascribed to SARS-CoV-2.

The COVID-19 pandemic caused by the spread of SARS-CoV-2 is both an unprecedented challenge for clinicians as well as a burden on the healthcare systems worldwide due to high infectivity and mortality rates. Given the rapid and catastrophic spread of COVID-19, the available treatment options had to be verified and investigated until a vaccine or other effective drug were developed. High hopes rested with plasma collected from COVID-19 survivors and immunoglobulin products.

Numerous randomized trials are underway to determine the efficacy of convalescent plasma therapy in COVID-19 infection [30].

According to recommendations of October 9th 2020 of the American National Institutes of Health (NIH) which conducts biomedical and health-related research, more than 70,000 patients in the US have already received CPT under the Mayo Clinic’s Expanded Access Program (EAP) although data from well-controlled, randomized trials are still insufficient to demonstrate effectiveness and safety of CPT for COVID-19.

Retrospective, indirect clinical efficacy studies based on EAP data conducted by the Food and Drug Administration (FDA) and the Mayo Clinic demonstrated that patients who received high titer convalescent plasma presented better therapeutic effects than those who were given lower titer plasma. This was also confirmed by the results of Mayo Clinic with regard to mortality rate; patients mortality was lower (22.3%) in the group that received high-titer convalescent plasma than in the group that received medium or low titer convalescent plasma; 27.4% and 29.6% [31] respectively. An exceptional response to therapy was observed when convalescent plasma was administered within 72 hours of COVID-19 diagnosis [32]. Adverse reactions for CPT are rare and comparable to administration of plasma for other indications.

Currently available scientific evidence confirms that the benefits of convalescent plasma in COVID-19 therapy outweigh the known and potential risks.

In order to minimize side effects following CPT several centers worldwide have made attempts at manufacturing hyperimmune anti-SARS-CoV-2 globulin (hIVIG) [33]. The immunoglobulin concentrate allows to administer neutralizing antibodies in a smaller volume of plasma and that should help to minimize the number of adverse reactions related to transfusion. Various methods are used to produce immunoglobulin concentrate. Vandeberg et al relied on the chromatographic method which gave an approximately 10 fold higher concentration of specific anti-SARS-CoV-2 antibodies as compared to the concentration in pooled convalescent plasma while the neutralizing activity of the antibodies in the final product is about 3 fold higher than in the plasma pool [34]. A patient subjected to hIVIG therapy is administered higher titer antibodies (higher neutralizing activity) in a volume equivalent to that of convalescent plasma. The final product contains 100% IgG while unwanted proteins such as IgM, IgA, anti-A, anti-B, anti-D antibodies are almost completely eliminated. IgM antibodies responsible for the intravascular haemolytic activity of anti-A and anti-B antibodies were removed to prevent intravascular hemolysis [35]. So, unlike for plasma, selection of ABO-compatible donors is not required.

For IgA deficient patients who may have been treated with blood derived products and developed anti-IgA antibodies, removal of IgA guarantees better therapeutic outcome of hIVIG as compared to convalescent plasma.

The potential advantage of hIVIG over convalescent plasma lies in the diversity of antibodies obtained from convalescent plasma pool and the range of antiviral activity is therefore wider [36]. The diversity may be important given the emergence of new variants of the SARS-CoV-2 virus. Diverse antibodies provide a wider range of antiviral activity by targeting different virus epitopes through different cellular mechanisms [32].

hIVIG may therefore prove therapeutically more effective than fresh frozen plasma collected from COVID-19 survivors.

Clinical trials of products obtained under the supervision of Vanderberg are underway and may soon provide important information on the efficacy and safety of anti-SARS-CoV-2 hIVIG [37].

Polish clinical trials on anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin concentrate conducted in cooperation with Biomed Lublin and the Institute of Hematology and Transfusion Medicine under the supervision of Professor Tomasiewicz (PROJECT No. 2020/ABM/COVID19/0036) are also worth mentioning.

Future of passive immunization

Significant advancement of monoclonal antibody technologies as well as the growing awareness of the role of antibodies in the combat against infectious diseases rationalizes further research into therapies based on passive immunization. Research into the development of antibody-based therapies is further strengthened by the emergence of antibiotic-resistant clinically significant bacteria (eg. *Staphylococcus aureus* or *Salmonella typhi*). Antibody half-life in vitro is typically short therefore passive immunization provides only temporary protection and needs to be repeated. Innovative technologies to extend the half-life of monoclonal antibodies raise high hopes. One such example is the mutation of the Fc region of an anti-RSV monoclonal antibody to increase its binding to the Fc receptor. This induces changes in the pharmacokinetics of human serum antibodies which increase to 100 from the typical 19–34 day half-life while maintaining virus-specific neutralizing activity. While passive immunization may be sufficient for prophylactic or therapeutic treatment of acute infection or disease in remission, long-term immunity requires active immunization with “engineered” vaccine. It should be emphasized that effective methods of passive immunization may serve as basis for the development of novel and high quality vaccines.

References

1. Niewiesk S. Maternal antibodies: clinical significance, mechanism of interference with immune responses, and possible vaccination strategies. *Front Immunol.* 2014; 5: 446, doi: [10.3389/fimmu.2014.00446](https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00446), indexed in Pubmed: 25278941.
2. Fischer A. Severe combined immunodeficiencies (SCID). *Clin Exp Immunol.* 2000; 122(2): 143–149, doi: [10.1046/j.1365-2249.2000.01359.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01359.x), indexed in Pubmed: 11091267.
3. Lederman HM, Winkelstein JA. X-linked agammaglobulinemia: an analysis of 96 patients. *Medicine (Baltimore).* 1985; 64(3): 145–156, indexed in Pubmed: 2581110.
4. Slička M, Amanna I. Passive Immunization. *Plotkin's Vaccines.* 2018: 84–95.e10, doi: [10.1016/b978-0-323-35761-6.00008-0](https://doi.org/10.1016/b978-0-323-35761-6.00008-0).
5. Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift.* 2009; 16(49): 1113–1114, doi: [10.1055/s-0029-1207589](https://doi.org/10.1055/s-0029-1207589).
6. Winau F, Winau R. Emil von Behring and serum therapy. *Microbes Infect.* 2002; 4(2): 185–188, doi: [10.1016/s1286-4579\(01\)01526-x](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(01)01526-x), indexed in Pubmed: 11880051.
7. Marano G, Vaglio S, Pupella S, et al. Convalescent plasma: new evidence for an old therapeutic tool? *Blood Transfus.* 2016; 14(2): 152–157, doi: [10.2450/2015.0131-15](https://doi.org/10.2450/2015.0131-15), indexed in Pubmed: 26674811.
8. Charakterystyka produktu leczniczego Gamma anty-HBs 200, „BIOMED-LUBLIN” Wytwórnia Surowic i Szczepionek Spółka Akcyjna.

9. Cohn EJ, Strong LE. Preparation and properties of serum and plasma proteins; a system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J Am Chem Soc.* 1946; 68: 459–475, doi: [10.1021/ja01207a034](https://doi.org/10.1021/ja01207a034), indexed in Pubmed: [21015743](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21015743/).
10. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* 1985; 228(4705): 1315–1317, doi: [10.1126/science.4001944](https://doi.org/10.1126/science.4001944), indexed in Pubmed: [4001944](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4001944/).
11. Alkan SS. Monoclonal antibodies: the story of a discovery that revolutionized science and medicine. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4(2): 153–156, doi: [10.1038/nri1265](https://doi.org/10.1038/nri1265), indexed in Pubmed: [15040588](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15040588/).
12. Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, et al. scFv antibody: principles and clinical application. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012: 980250, doi: [10.1155/2012/980250](https://doi.org/10.1155/2012/980250), indexed in Pubmed: [22474489](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22474489/).
13. Steinwand M, Droste P, Frenzel A, et al. The influence of antibody fragment format on phage display based affinity maturation of IgG. *MAbs.* 2014; 6(1): 204–218, doi: [10.4161/mabs.27227](https://doi.org/10.4161/mabs.27227), indexed in Pubmed: [24262918](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24262918/).
14. Lu RM, Hwang YC, Liu IJ, et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci.* 2020; 27(1): 1, doi: [10.1186/s12929-019-0592-z](https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z), indexed in Pubmed: [31894001](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31894001/).
15. Marasco WA, Sui J. The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics. *Nat Biotechnol.* 2007; 25(12): 1421–1434, doi: [10.1038/nbt1363](https://doi.org/10.1038/nbt1363), indexed in Pubmed: [18066039](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18066039/).
16. Cao W, Liu X, Bai T, et al. High-dose intravenous immunoglobulin as a therapeutic option for deteriorating patients with coronavirus disease 2019. *Open Forum Infect Dis.* 2020; 7(3): ofaa102, doi: [10.1093/ofid/ofaa102](https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa102), indexed in Pubmed: [32258207](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32258207/).
17. Jawhara S. Could intravenous immunoglobulin collected from recovered coronavirus patients protect against COVID-19 and strengthen the immune system of new patients? *Int J Mol Sci.* 2020; 21(7), doi: [10.3390/ijms21072272](https://doi.org/10.3390/ijms21072272), indexed in Pubmed: [32218340](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32218340/).
18. Who Mers-Cov Research Group. State of knowledge and data gaps of middle east respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) in Humans. *PLoS Curr.* 2013; 5, doi: [10.1371/currents.outbreaks.0bf719e352e7478f8ad85fa30127ddb8](https://doi.org/10.1371/currents.outbreaks.0bf719e352e7478f8ad85fa30127ddb8), indexed in Pubmed: [24270606](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24270606/).
19. Shen C, Wang Z, Zhao F, et al. Treatment of 5 critically ill patients with COVID-19 with convalescent plasma. *JAMA.* 2020; 323(16): 1582–1589, doi: [10.1001/jama.2020.4783](https://doi.org/10.1001/jama.2020.4783), indexed in Pubmed: [32219428](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32219428/).
20. Hung IFN, To KKW, Lee CK, et al. Convalescent plasma treatment reduced mortality in patients with severe pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus infection. *Clin Infect Dis.* 2011; 52(4): 447–456, doi: [10.1093/cid/ciq106](https://doi.org/10.1093/cid/ciq106), indexed in Pubmed: [21248066](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21248066/).
21. Luke TC, Casadevall A, Watowich SJ, et al. Hark back: passive immunotherapy for influenza and other serious infections. *Crit Care Med.* 2010; 38(4 Suppl): e66–e73, doi: [10.1097/CCM.0b013e3181d44c1e](https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181d44c1e), indexed in Pubmed: [20154602](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20154602/).
22. Gould EW. Human serum in the treatment of influenza bronchopneumonia *N Y Med J.* 1919; 109: 666–667.
23. Holst J. Convalescent serum in the treatment of influenza *Nor Mag Laegevidenskaben.* 1919; 80: 31–561.
24. Huff-Hewitt W. Human serum in influenza. *Br Med J.* 1919; 1: 575.
25. Griensven Jv, Edwards T, Lamballerie Xde, et al. Evaluation of convalescent plasma for Ebola virus disease in Guinea. *N Engl J Med.* 2016; 374(1): 33–42, doi: [10.1056/nejmoa1511812](https://doi.org/10.1056/nejmoa1511812), indexed in Pubmed: [26735992](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26735992/).
26. Who Mers-Cov Research Group. State of Knowledge and Data Gaps of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) in Humans. *PLoS Curr.* 2013; 5, doi: [10.1371/currents.outbreaks.0bf719e352e7478f8ad85fa30127ddb8](https://doi.org/10.1371/currents.outbreaks.0bf719e352e7478f8ad85fa30127ddb8), indexed in Pubmed: [24270606](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24270606/).
27. Wong VWS, Dai D, Wu AKL, et al. Treatment of severe acute respiratory syndrome with convalescent plasma. *Hong Kong Med J.* 2003; 9(3): 199–201, indexed in Pubmed: [12777656](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12777656/).
28. <https://microbenotes.com/neutralization-test-introduction-and-types>.
29. Cheng Y, Wong R, Soo YOY, et al. Use of convalescent plasma therapy in SARS patients in Hong Kong. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005; 24(1): 44–46, doi: [10.1007/s10096-004-1271-9](https://doi.org/10.1007/s10096-004-1271-9), indexed in Pubmed: [15616839](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15616839/).
30. Piechotta V, Iannizzi C, Chai KLi, et al. Convalescent plasma or hyperimmune immunoglobulin for people with COVID-19: a rapid review. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020; 5: CD013600, doi: [10.1002/14651858.CD013600](https://doi.org/10.1002/14651858.CD013600), indexed in Pubmed: [32406927](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32406927/).
31. Joyner MJ, Carter RE, Senefeld JW, et al. Convalescent plasma antibody levels and the risk of death from Covid-19. *N Engl J Med.* 2021; 384(11): 1015–1027, doi: [10.1056/NEJMoa2031893](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2031893), indexed in Pubmed: [33523609](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33523609/).
32. Food and Drug Administration. EUA 26382: emergency use authorization (EUA) request; 2020.
33. <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-clinical-trial-testing-hyperimmune-intravenous-immunoglobulin-plus-remdesivir-treat-covid-19-begins>.
34. Vandeberg P, Cruz M, Diez JM. Production of anti-SARS-CoV-2 hyperimmune globulin from convalescent plasma *bioRxiv* 2020. 11; 18: 388991, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.11.18.388991>.
35. Flegel WA. Pathogenesis and mechanisms of antibody-mediated hemolysis. *Transfusion.* 2015; 55 Suppl 2: S47–S58, doi: [10.1111/trf.13147](https://doi.org/10.1111/trf.13147), indexed in Pubmed: [26174897](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26174897/).
36. Liu L, Wang P, Nair M, et al. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature.* 2020; 584(7821): 450–456, doi: [10.1038/s41586-020-2571-7](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2571-7), indexed in Pubmed: [32698192](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32698192/).
37. Inpatient treatment with anti-coronavirus immunoglobulin (ITAC) [monograph on the internet]. *clinicaltrials.gov*; 2020. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04546581>.

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

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

Zakład Wirusologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

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

Należy cytować wersję pierwotną.

Streszczenie

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

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

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

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

J. Transf. Med. 2021; 14: 58–72

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

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

Wstęp

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

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

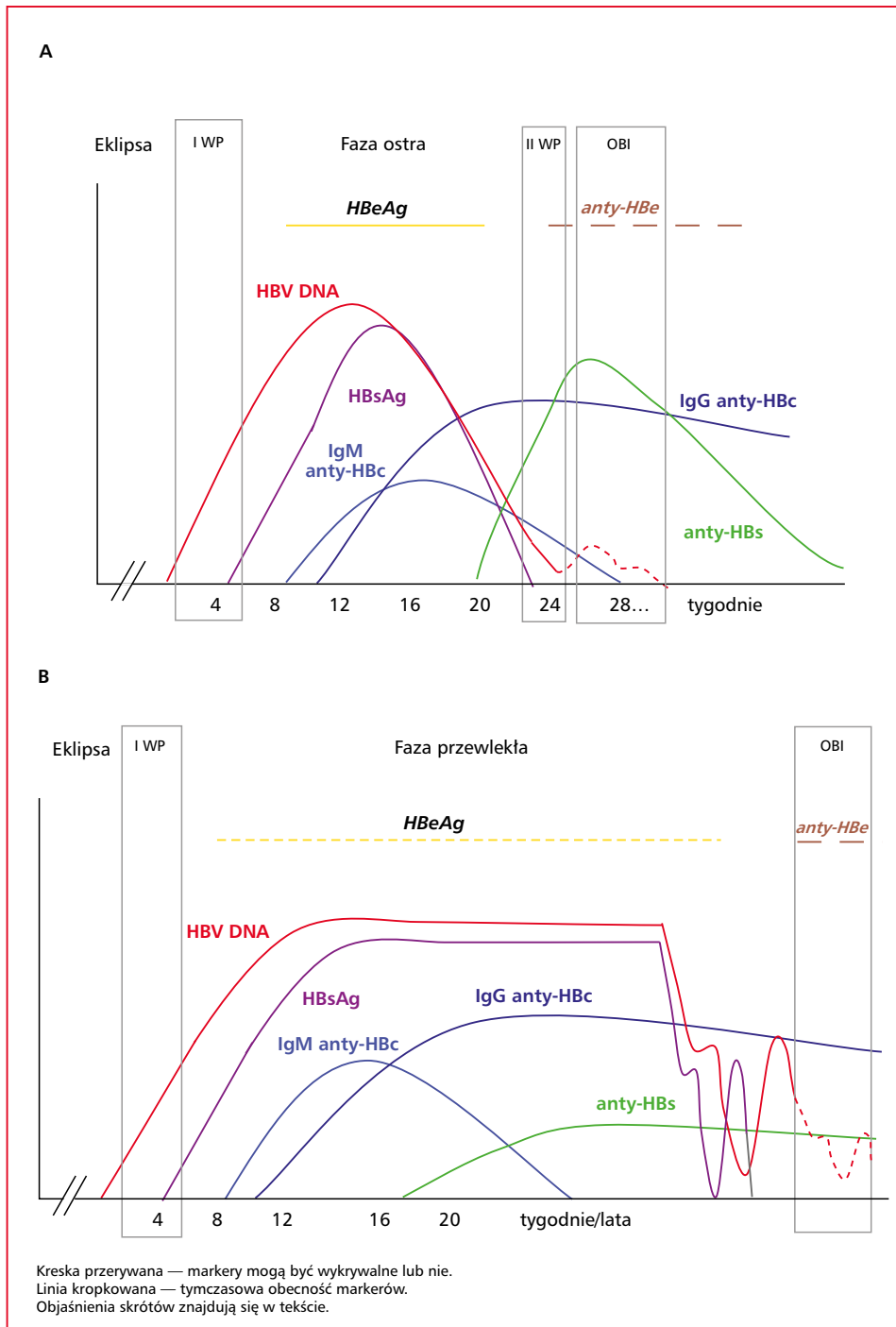
różnych strategii: od badania pojedynczych donacji (IDT, *individual donation testing*) do minipool złożeń z 96 donacji (MP, *minipools*) [8]. W kilku krajach Europy, w Stanach Zjednoczonych i Japonii każda donacja badana jest dodatkowo w kierunku anty-HBc — markera trwającego, ale także przebytego zakażenia.

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

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

Przebieg zakażenia HBV — markery we krwi

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



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

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

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

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

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

Markery zakażenia HBV badane przeglądowo u krwiodawców

HBsAg

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

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

anti-HBc

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

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

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

Marker molekularny — HBV DNA

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

HBV DNA we krwi we wczesnych HBsAg-ujemnych fazach zakażenia

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

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

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

HBV DNA w zakażeniu ukrytym

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

Ryzyko przeniesienia HBV przez transfuzję i metody jego ograniczania

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

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

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

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

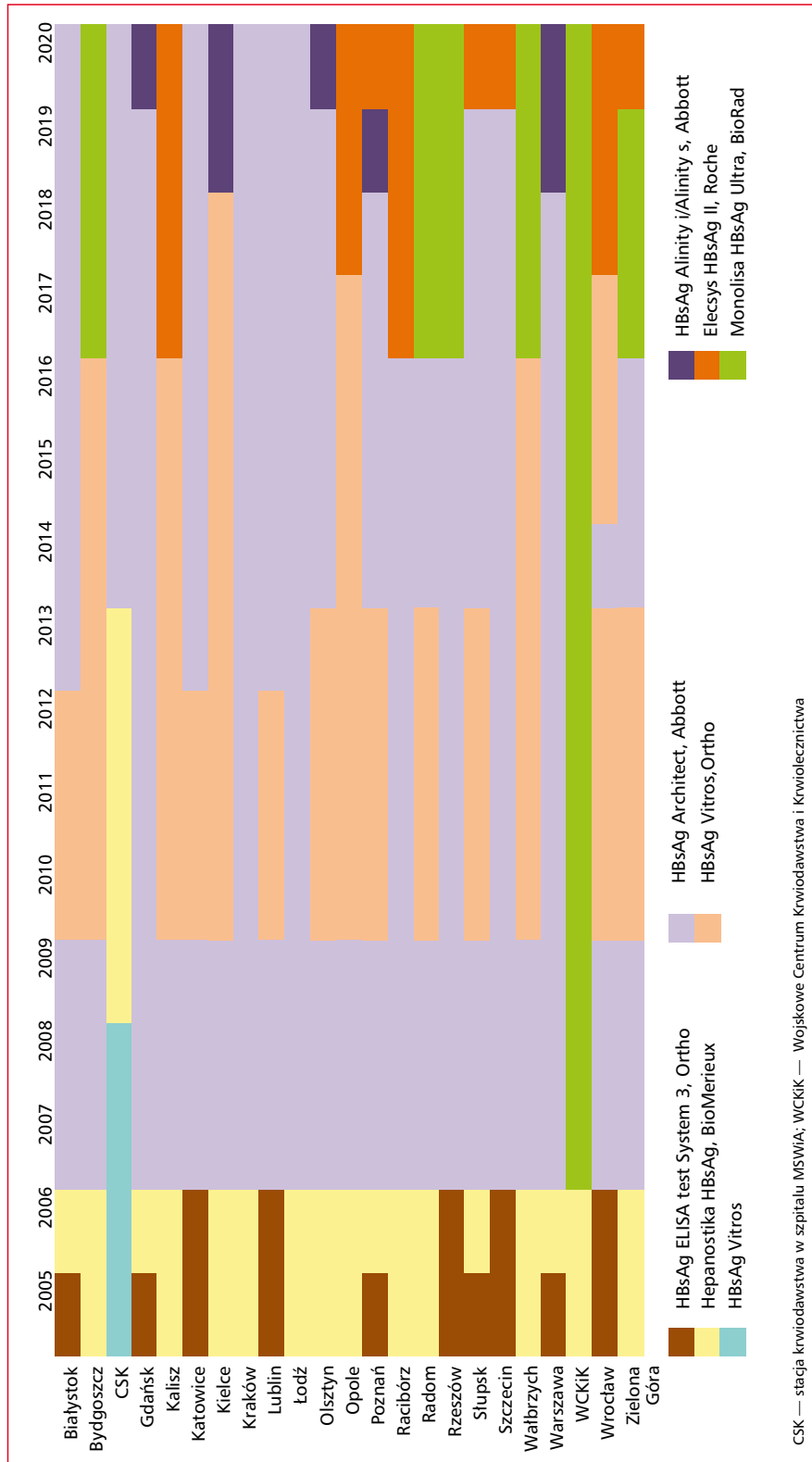
Badania przeglądowe HBsAg

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

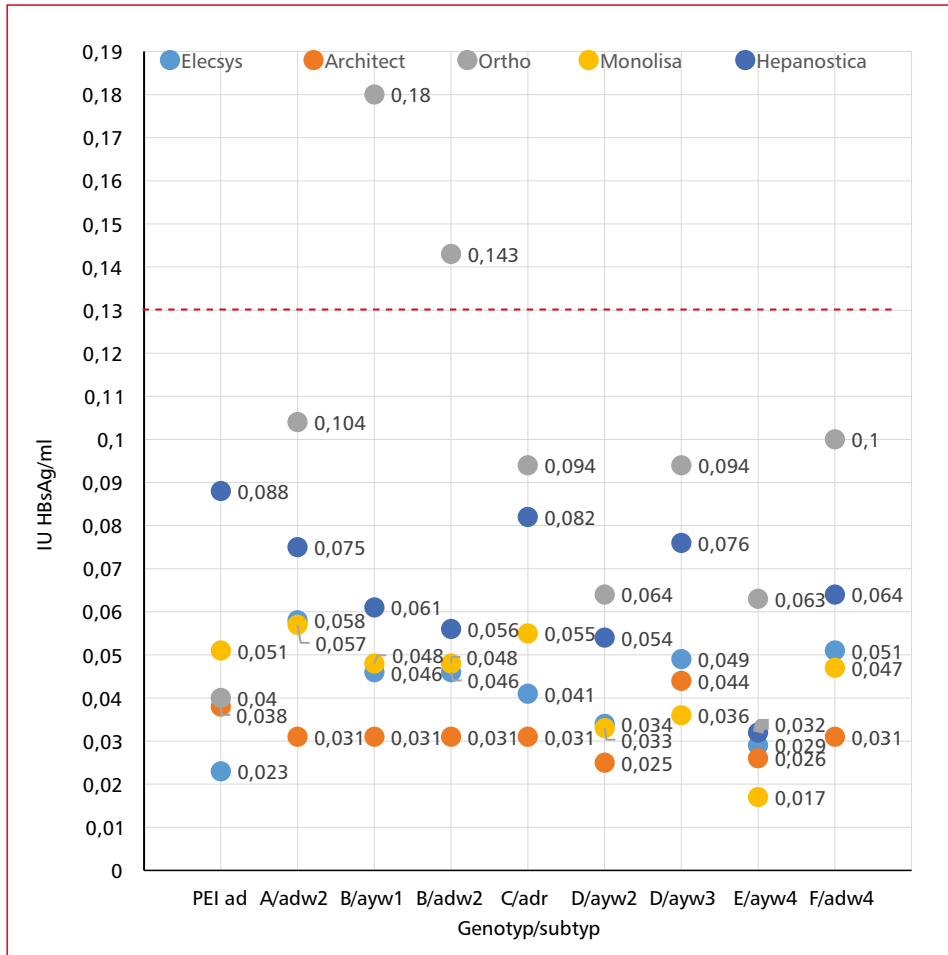
System 3 (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ, USA). Od roku 2007 zastępowano je sukcesywnie testami chemiluminescencyjnymi (CMIA, *chemiluminescent microparticle immunoassay*) Architect HBsAg Qualitative lub Quantitative (Abbott Diagnostics, Niemcy), od 2010 również Vitros HBsAg ES (Ortho Clinical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

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

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



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



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

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

Badanie przeglądowe HBV DNA

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

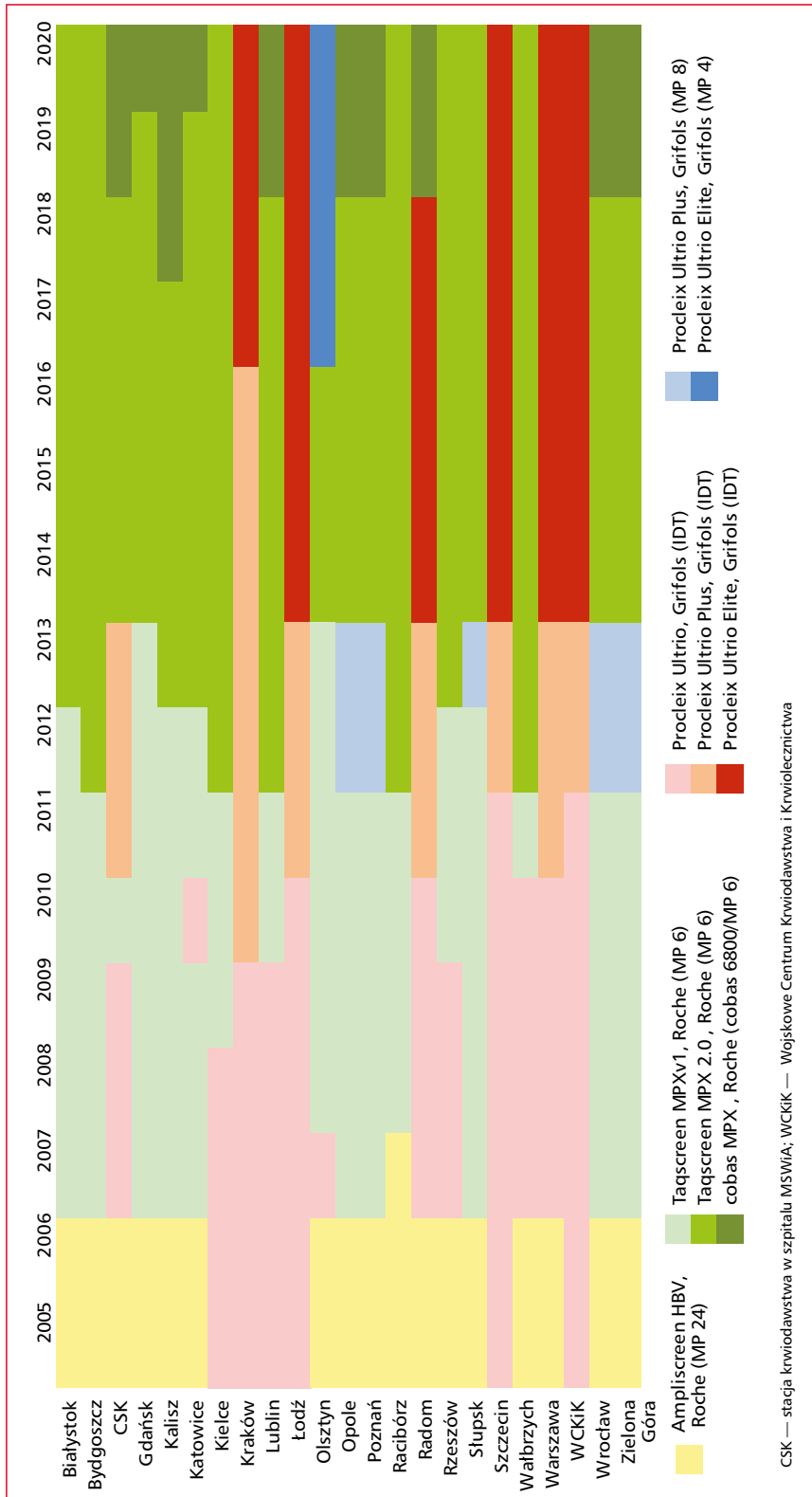
W niniejszym artykule czulość stosowanych testów NAT oraz czulość formatu badań (IDT/ /puli) dla wykrycia zakażenia w osoczu dawcy — po uwzględnieniu rozcieńczenia przez donacje wchodzące w skład puli — przedstawiono jako 95% LoD.

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

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

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

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



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

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

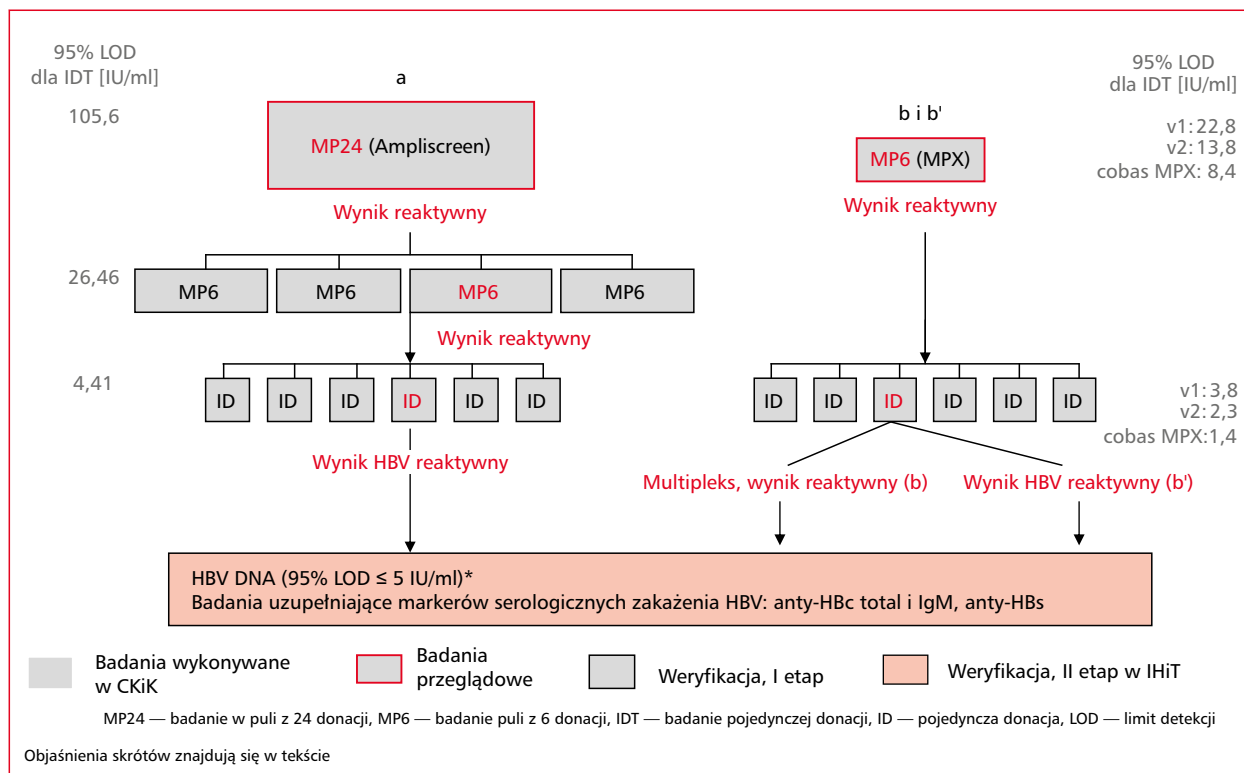
Test (badania przeglądowe, pośrednie, powtórkowe)	Czułość testu* — 95% LOD [IU/ml]	Format	Czułość dla donacji — 95% LOD [IU/ml]	Konieczność badań pośrednich lub powtórkowych/badań różnicujących (95% LOD [IU/ml])	Weryfikacja w IHIT donacji z wynikiem ID reaktywnym w teście:	Okres stosowania
Ampliscreen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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

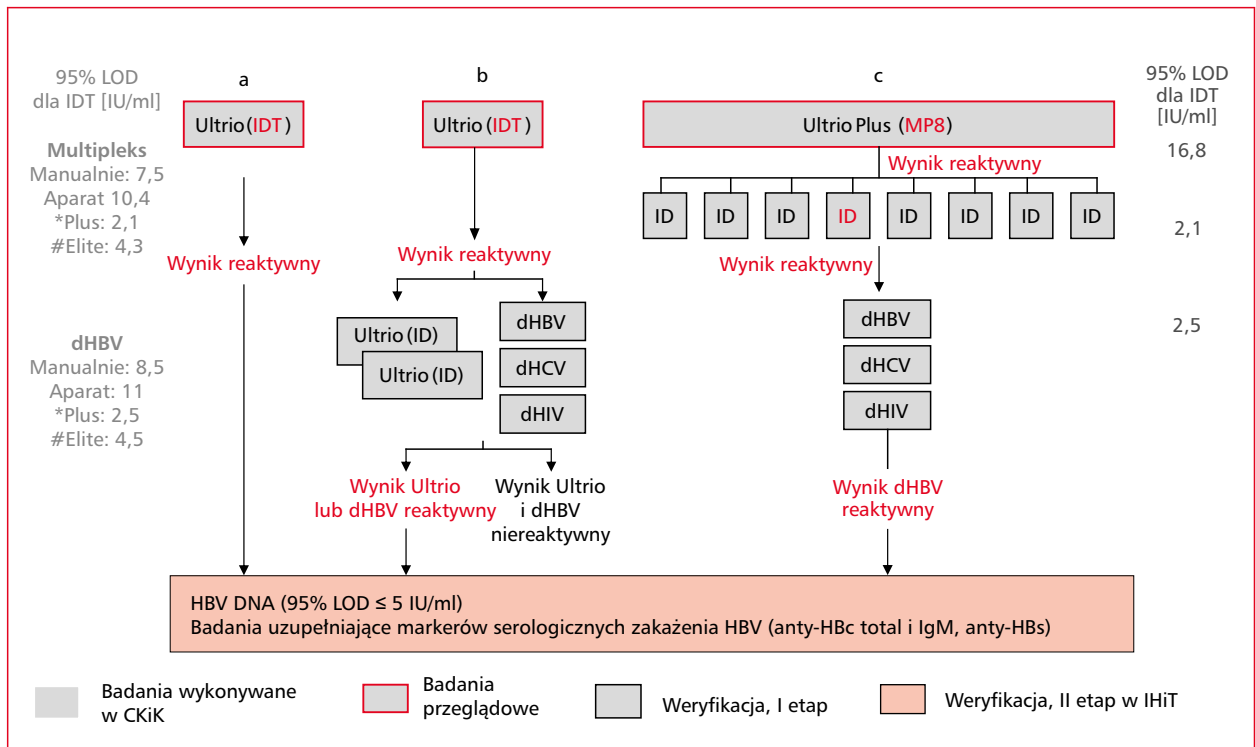
i był ściśle powiązany ze sposobem prowadzenia badania przeglądowego (ryc. 5, 6, tab. 1).

Weryfikacja I etap w RCKiK

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

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

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



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

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

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

Weryfikacja II etap w IHiT

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

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

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

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

Stan obecny i perspektywy badań przeglądowych HBV u krwiodawców

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

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

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

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

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

Podziękowanie

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

Piśmiennictwo

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

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

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

Strategies for hepatitis B virus screening of Polish blood donors (2005–2020)

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

Department of Virology, Institute of Hematology and Transfusion Medicine, Warsaw

Summary

The risk of hepatitis B virus (HBV) transmission through blood and blood components is markedly reduced through serologic testing of each donation for the presence of HBV infection markers. Testing for hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) is obligatory almost everywhere in the world. Several countries have also implemented testing for antibodies to hepatitis B core antigen (anti-HBc) and some perform HBV DNA tests, either in single donations or minipools of up to 96 donations. In countries with obligatory hepatitis B vaccination, the incidence of HBsAg-positive infections has been on the decline. Questions are therefore raised regarding the choice of optimal strategies for blood donor screening.

In Poland, screening for hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) to identify HBV infected donors was initiated in 1971. Pursuant to the guidelines of the Council of Europe, the analytical sensitivity of 0.13 IU/ml is required for a HBsAg screening test to detect a HBsAg-positive infection. In 2005, HBV-DNA testing was added to the panel of screening tests for further reduction of HBV transmission risk through blood and blood components.

The study presents the analysis of the HBsAg and HBV-DNA screening tests used in Poland so far. The analysis is based on the author's doctoral dissertation and the outcome may largely contribute to the process of determining the effectiveness of the methods used up to date and to development of an optimal panel of HBV screening tests for Polish blood donors.

Key words: hepatitis B virus (HBV), HBV screening tests, HBV-DNA, HBsAg

J. Transf. Med. 2021; 14: 73–86

Introduction

Hepatitis B virus (HBV), responsible for a wide spectrum of liver diseases ranging from acute to chronic, is one of the most significant clinical and epidemiological challenges worldwide [1]. HBV is transmitted through blood, semen and other body fluids of infected persons. Due to the high infectivity of HBV transmitted through blood, blood transfusion services worldwide are actively

involved in controlling the risk of transfusion transmitted HBV (TT-HBV). Blood from phases with detectable antigen HBs (HBsAg) and the highest viral load characteristic of symptomatic hepatitis B has been found the most infectious. However, TT-HBV may also occur through blood from phases with no detectable HBsAg — usually with lower viral load and asymptomatic course [2]. The first method of reducing the risk of TT-HBV is the qualification of the blood donor (based on medical

Correspondence address: PhD of medical science Aneta Kopacz, Department of Virology, Institute of Hematology and Transfusion Medicine in Warsaw, Chocimska Street 5, 00–957 Warszawa, e-mail: akopacz@IHTM.waw.pl

Translation: mgr Krystyna Dudziak

This article is available in open access under Creative Common Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) license, allowing to download articles and share them with others as long as they credit the authors and the publisher, but without permission to change them in any way or use them commercially.

history and physical examination). As many as 2/3 of infected people are asymptomatic or present non-specific symptoms, so despite donor qualification procedures, HBV is still a serious risk factor for transfusion-related adverse reactions. In the recent years, development of pathogen inactivation methods has become increasingly significant. Unfortunately they are not fully effective and the accessibility is limited [3, 4].

To minimize the transfusion-related risk of HBV transmission various HBsAg, HBV DNA and anti-HBc screening tests are in use worldwide. HBsAg screening tests are capable of detecting acute and chronic infections though not in all phases and forms due to insufficient test sensitivity [5]. The obligation to test individual donations for HBsAg is imposed by Directive 2002/98/EC defining the quality and safety standards for the collection, testing, preparation, storage and issue of human blood and blood components. The test is also recommended by the Council of Europe [6, 7]. On the other hand, HBV DNA screening tests implemented in 2002 identify not only HBsAg-positive phases (with detectable HBsAg) but also HBsAg-negative phases (with undetectable HBsAg). Nucleid Acid Testing (NAT) for HBV is used by 40 countries worldwide and various strategies are employed ranging from single donation testing (IDT) to mini-pool tests of 96 donations (MP96) [8]. In several European countries as well as in the USA and Japan, each donation is also screened for anti-HBc — a marker of ongoing and past infection.

Better quality and availability of tests as well as possibility of identifying various infection stages triggered discussions on the optimal choice of screening tests (markers and algorithms) for detection of the largest possible number of infected donors [9, 10] while availability of blood for transfusion is ensured i.e. by not deferring people whose blood does not transmit the virus.

Before joining the discussion, we decided to first summarize and present the algorithms used so far for HBV-DNA testing in Polish Blood Transfusion Centers (BTC).

HBV infection markers — course of infection

HBV infection is a dynamic process. The course of HBV infection and its markers depend on viral load and immune response (Fig. 1) [11]. In a couple of weeks following the eclipse phase the HBV markers appear in blood in the same sequence regardless of the course of infection (asymptomatic, acute or chronic) [12]. During the

first weeks after exposure the virus replicates and intensive protein expression occurs (increment of hepatitis viral load in liver) as demonstrated by higher HBV-DNA and HBsAg levels in blood. The period of time between infection and reliable test detection is called the I window period (WP 1) [13, 14]. From the 6th week onwards, anti-HBc antibodies are detected: first IgM, then IgG. High IgM anti-HBc antibody concentration persists for 2–6 months and is characteristic of acute infection [15]. Acute viral hepatitis may present with elevated level of aminotransferase (ALT), jaundice and flu-like symptoms [16].

If the acute-phase infection is self-limiting, HBsAg is no longer detectable in blood within 6 months and clinical symptoms (including hepatitis), if previously observable, now disappear while laboratory parameters (such as elevated ALT level) become normal. One of the last periods of self-limiting infection is the II Window Period (II WP) when HBsAg concentration decreases to undetectable values in the presence of anti-HBc IgM antibodies and low levels of HBV DNA. HBV DNA and HBeAg in blood are usually absent as well. Detectable are antibodies to virus antigens: anti-HBc with or without anti-HBe and anti-HBs [14]. Persistence of HBsAg with no HBV DNA may indicate self-limiting infection which was accompanied by integration of hepatitis virus S gene the pre-S/S fragment into the host genome [17, 18]. On the other hand, the prolonged presence of HBV DNA, at a level below 200 IU/ml, with undetectable HBsAg with or without anti-HBc and/or anti-HBs in blood is suggestive of incomplete control of the immune system over virus replication i.e. transition to Occult Hepatitis B Infection (OBI) [17, 19].

In case of non self-limiting infection, HBsAg and usually HBV DNA are detectable in blood for > 6 months and the infection is chronic. HBsAg and anti-HBc are detected for months/years while HBV DNA and HBeAg are present depending on the infection phase. Anti-HBe and anti-HBs antibodies are undetectable and the infection is periodically asymptomatic. Chronic as well as acute phase infection may pass into inactive HBsAg carrier state with undetectable HBV DNA or occult HBV infection [19, 20].

Blood donor screening for HBV infection markers

HBsAg testing

The HBs antigen (HBsAg) is the first serological marker of HBV infection which is detectable with immunological methods. With routine tests

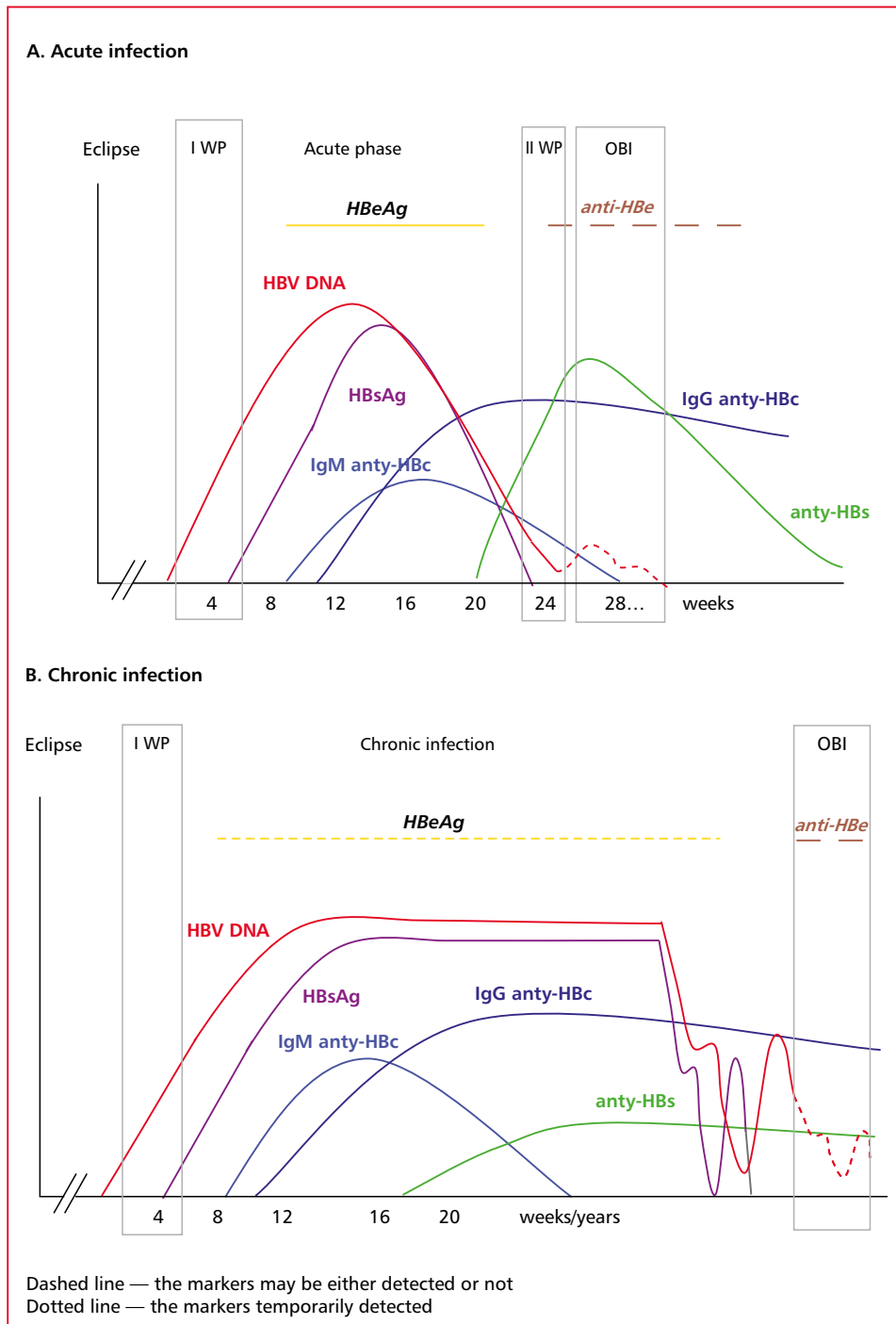


Figure 1. Course of HBV infection — I WP, II WP and Occult HBV Infection (OBI) [14, 21])

(0.05–0.5 IU/ml sensitivity) HBsAg can be detected in blood as of 4th week of infection (2–10 weeks) [15]. According to Korelitz, in acute self-limiting infection HBsAg is detected for an average of 63 days. Decline of HBsAg concentration occurs, among others, as a result of the neutralizing effect of anti-HBs antibodies [14, 22]. The presence of HBs antigen in the acute and chronic infection phase positions it as the most important serological

marker both diagnostically and clinically. Following the Council of Europe recommendations, screening tests should detect at least 0.13 IU of HBsAg/ml in blood [7]. The analytical sensitivity of the HBsAg test is verified on the basis of the test of international panels (International Standard, IS; Paul Ehrlich-Institut, PEI). Scheiblauer’s analysis of 70 HBsAg tests showed that only 23/51 EIA tests and 0/17 rapid tests had the sensitivity of

≤ 0.13 IU/mL in the PEI HBsAg Standard subtype ad trial. Moreover, the examination of a panel of the most common HBV genotypes (A–F) revealed different sensitivity of the tests for each genotype. As many as 6/23 tests detecting 0.13 IU HBsAg PEI/ml had lower sensitivity in relation to 2 or more tested genotypes. Scheiblauer also showed that the sensitivity of HBsAg tests may be different as regards HBV mutants. There are a number of recognized HBV genome mutations that induce amino acid changes, e.g. M133L, P105R, T131L, Q101H, S143L. These render HBsAg undetectable by tests of sensitivity ≤ 0.13 IU/ml or reduce the likelihood of detection as compared to standard phenotype [23]. In order to detect the highest possible number of HBV polymorphs, the selection of the screening test should therefore be preceded by an analysis of the test sensitivity against as many HBV polymorphs as possible. In 2017 and 2018, new enzyme immunoassay methods were described with sensitivity of 0.0005–0.005 IU HBsAg/ml. The studies of Shinkai N. et al. and Deguchi M. et al. demonstrate the most recent HBsAg tests to be almost as effective for viremia detection as NAT tests. Their effectiveness in blood transfusion has not however been evaluated [24, 25].

anti-HBc

Antibodies to HBV core antigen (anti-HBc) are important diagnostic markers of HBV infection. During acute infection phase anti-HBc IgM and IgG of the same specificity appear 1–2 weeks after the presence of HBsAg. IgG antibodies which follow IgM are considered persistent infection markers. In the acute infection phase anti-HBc IgM persist for 2–6 months- most of the time at high concentration and then wear off [4]. Anti-HBc IgM may also appear in exacerbation stages of chronic infection but at concentrations lower than in the acute infection phase [4, 15]. In fulminant hepatitis B cases with enhanced immune response that eliminates hepatocytes with multiplied HBV, anti-HBc IgM may be the only detectable serological marker of infection. There are also reports of infections in which anti-HBc is not detected [26, 27].

In some countries, mostly with low endemicity of HBV, blood donors are screened for anti-HBc. The test is not common mostly due to low specificity (estimated at 16–75%), as well as difficulties with interpretation of results for lack of confirmation test. Failure to rule out false-reactive results obviously must lead to donor loss. The anti-HBc test is not used in countries with high and medium endemicity of HBV where the number of anti-HBc

carriers with no HBsAg exceeds 5%. Deferral of donors with anti-HBc would lead there to reduction in the supply of blood and blood components [28].

DNA HBV — molecular marker

HBV DNA is detectable in blood during most stages of infection when the virus replicates in the liver [21, 29, 30]. Due to high sensitivity molecular diagnostic tests (95% LOD below 200 IU DNA HBV/ml of plasma) based either on techniques of Transcription Mediated Amplification (TMA) or polymerase chain reaction (PCR), the HBV infection can be detected not only in HBsAg-positive phases but also in HBsAg-negative phases as WP and OBI when HBsAg is undetectable [31–34]. NAT testing also identifies HBV polymorphic forms undetectable in HBsAg testing due to antigen mutant conformation caused by the so-called escape mutations [35]. Directive 2002/98/EC poses no obligation on EU countries to test HBV DNA in blood donors. However, such tests are recommended by the Council of Europe and implemented both in high- and low-endemic countries as they contribute to minimizing the transfusion-transmitted HBV (TT-HBV) risk by identifying cases of HBsAg-negative infection [6, 7, 36].

HBV DNA in blood during the early HBsAg-negative stages of infection

The currently available HBV diagnostic tests based on NAT such as polymerase chain reaction (PCR) and transcription mediated amplification (TMA) enable identification of HBV infection even before HBsAg appears, i.e. in the I serological window [14]. The HBV median doubling time is about 2.6 days (2.2–15.2) and is relatively slow as compared to e.g. HIV or HCV. The slow rate of HBV multiplication implies relatively long time for the viral load to reach levels detectable with diagnostic methods [2]. The probability of HBV DNA detection in the 1st WP depends therefore on the sensitivity of the test [29]. The NAT method (sensitivity of 3.4 IU/ml) allows for detection of the genetic material of HBV as early as 3 weeks before HBs antigen, provided the minimum sensitivity HBs antigen test is 0.13 IU/ml [37]. Detection HBsAg after approximately 4 weeks of viral multiplication, i.e. when HBV DNA concentration exceeds 3×10^2 IU/ml, marks the end of the serological window phase [38, 39].

In self-limiting acute infections, after about 2 month presence of HBsAg in blood, the DNA concentration is reduced by half every 1.6 (0.9–6.3) days [13]. Reduction of viremia is associated with

HBe and HBs seroconversion as well as neutralization of HBsAg particles [15]. Effective limitation of infection involves a 10-day serological window II during which HBs antigen is undetectable at HBV DNA below 10^3 IU/ml and the presence of both class anti-HBc antibodies. Using a mathematical model, Vermeulen et al estimated that the genetic material of the virus should be detectable with NAT test (sensitivity of 3.4 IU/ml (95% LOD) during 8.7/ of the 10 days of II WP [14].

HBV DNA in occult HBV infection

Occult HBV infection (OBI) is a form of infection characterized by HBV DNA replication in the liver with or without HBV DNA detected in peripheral blood of HBsAg-negative men with or without other serologic markers of previous viral exposure [40, 41]. HBV DNA blood levels in OBI fluctuate, resulting in alternating presence or absence of DNA-emia every several weeks/months/years [42–44]. In most identified occult infections, DNA-emia in blood did not exceed 200 IU/ml. Analysis of OBI serological markers revealed anti-HBc and/or anti-HBs antibodies in at least 80% of cases (the so-called seropositive OBI) and in 1–20% of cases the antibodies were undetectable (the so-called seronegative OBI) [40, 41]. In over 90% of seropositive OBI cases, anti-HBc antibodies were detected either with or without anti-HBs. In the remaining few percent of seropositive OBI cases, anti-HBs antibodies are detectable with no anti-HBc. These are the so-called cases of “OBI with only anti-HBs present” [34].

The risk of HBV transmission by transfusion and methods of minimizing the risk

By 1970 approximately 6% of world population subjected to multiple transfusions of blood components were found infected. The risk of TT-HBV infection was reduced to 0.6–2.22/million donations in low-endemic countries and up to 22.9–45.5/million donations in high-endemic countries after implementation of HBsAg screening and deferral for donor candidates and donors who reported hepatitis B in the pre-donation questionnaire and medical interview or whose behavior suggested higher infection risk [10]. With additional HBV DNA tests, the residual risk of TT-HBV is estimated to be several fold lower, within the range of 0.13–0.6/million donations in low-endemic countries and more than 100/mln in high-endemic countries. The TT-HBV risk has been found dependent on

the epidemiological situation among donors, the sensitivity of screening tests and the mathematical models used for risk estimation [10, 28]. The recent OBI analyzes indicate that TT-HBV in Poland significantly exceeds 0.6/million donations and is one of the highest worldwide [10].

HBV screening of Polish blood donors; 2005–2020

In the years 2005–2020, the identification of HBV infections in Polish blood donors was based on HBsAg and HBV DNA screening tests performed in public blood establishments (Blood Transfusion Centers, BTC). The testing procedures followed the IHTM recommendations specified in subsequent versions of the “*Medical Standards for Collection, Preparation and Issue/Distribution of blood and blood components in organizational units of the public blood transfusion service*” (published since 2006) as well as the Decree of the Minister of Health of June 9th 2017 as regards *Requirements of good manufacturing practice referring to collection, testing, preparation, storage, issue and transport of blood and blood components for organizational units of the public blood transfusion service, as amended* [45–48]. HBsAg was always tested in single donations, while HBV DNA either in single donations or equal volume plasma pools from “n” donor samples (n = 24 or 8 or 6 or 4).

HBsAg screening tests

In 2005–2008, HBs antigen screening was performed in single donations with enzyme immunoassays: Hepanostica Uniform II (BioMerioux, Lyon, France) or EIA System 3 (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ, USA). Since 2007, these assays were successively replaced by the chemiluminescent assays (CMIA) Architect HBsAg Qualitative or Quantitative (Abbott Diagnostics, Germany), and since 2010 also Vitros HBsAg ES (Ortho Clinical Diagnostics Inc., NJ, USA). Since 2017, blood transfusion centers (BTC) switched to electrochemiluminescence method “ECLIA” Elecsys (Roche Diagnostics GmbH, Germany) and Monolisa HBsAg Ultra (Bio-Rad, France). Following recommendations, BTC purchased tests in tender procedures and used different tests in different time periods (Fig. 2). The analytical sensitivity of all tests allowed detection of at least 0.13 IU HBsAg IS/ml. Scheiblaue performed studies on clinical sensitivity of HBsAg tests. The studies revealed different sensitivity for the A–F genotypes. All tests however, with the exception of Ortho EIA

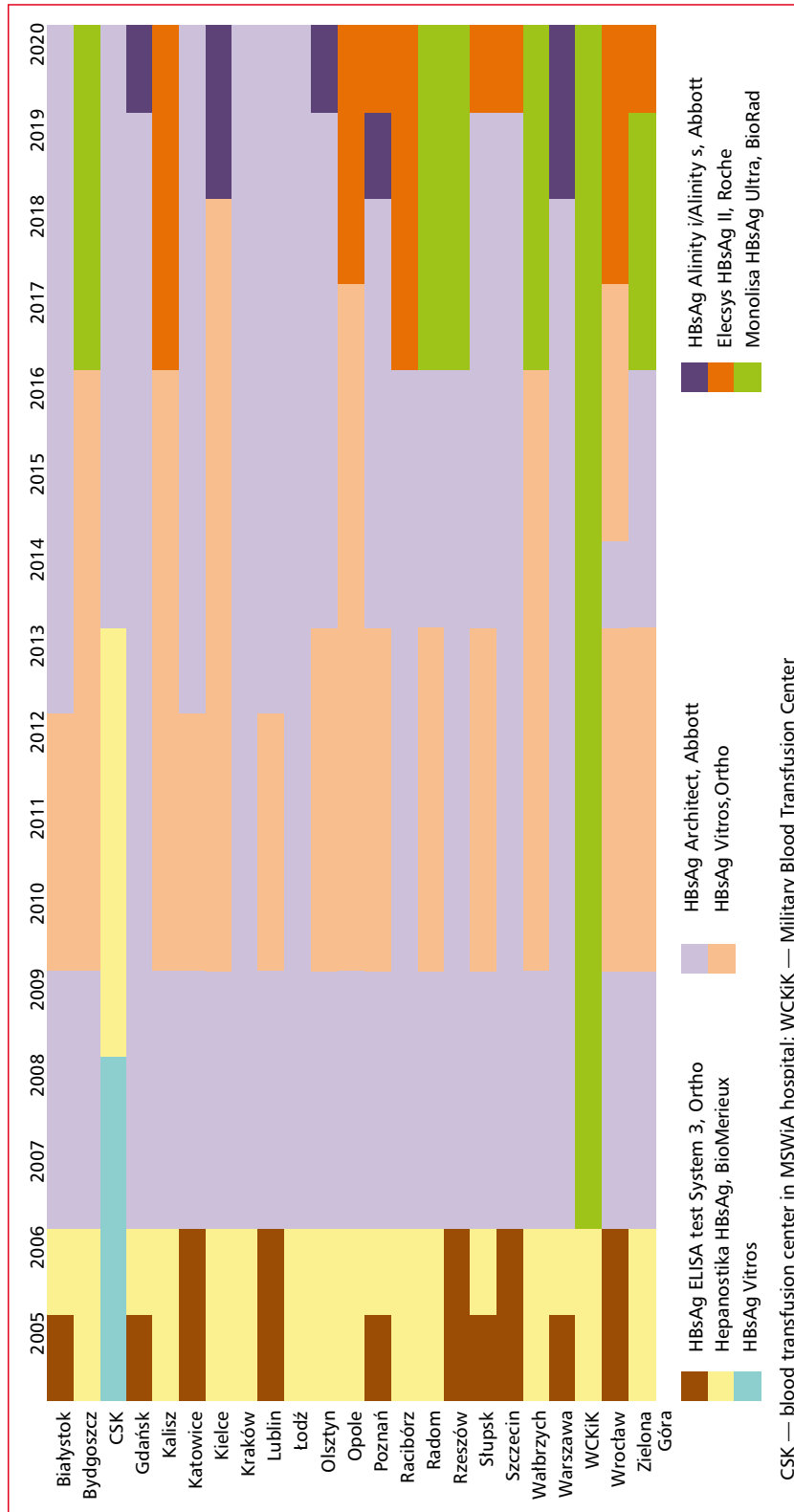


Figure 2. Methods of HBsAg screening used in Polish blood transfusion service (2005–2020)

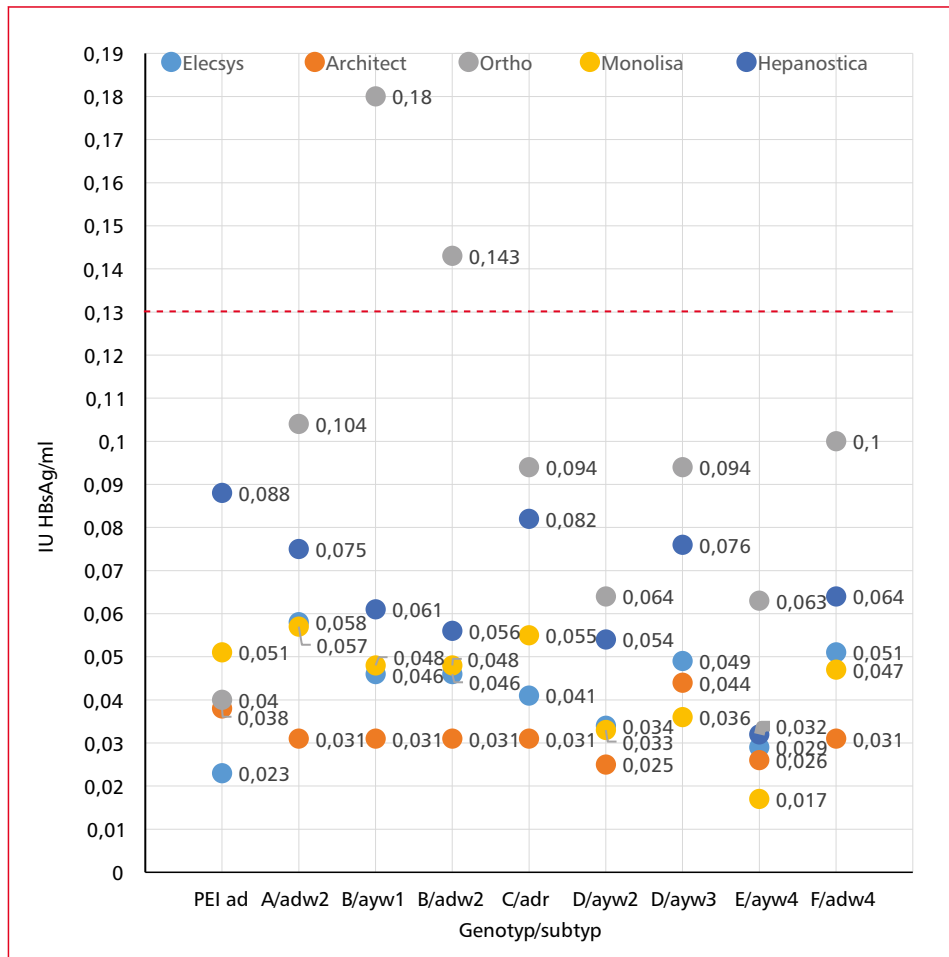


Figure 3. Clinical sensitivity of HBsAg test used in BTC in 2005–2020 [23]

System 3, allowed detection of 0.13 IU HBsAg/ml (Fig. 3). The sensitivity of Ortho EIA System 3 test was lower in relation to genotype B of the ayw1 and adw2 serotypes and did not detect 0.13 IU HBsAg/ml of these polymorphic forms. It should be noted however that the Ortho test, like all the other tests used in Poland, detected infection in all 146 positive samples of the genotype panel, including 12 B/adw2 and 17 B/ayw1 and polymorphic forms with M133L (0.21 IU/ml), P105R (0.22 IU/ml), T131L (0.36 IU/ml), Q101H (72 IU/ml), S143L (> 8000 IU/ml) mutations [23].

In the same period, obligatory HBV DNA tests were performed in Polish blood transfusion service. Changes in the HBsAg screening methods used in 2005–2020 are presented in Figure 2, and those for HBV DNA are shown in Figure 4. The implemented algorithms for HBV screening and confirmation rely both on serological and molecular methods.

A sample reactive in the screening test was labelled Initial Reactive (IR) and according to the applicable algorithm, the test was repeated twice

on the same sample. If both results were negative, the IR donation was considered biological false reactive (BFR) and if no HBV DNA was detected, the donation could be issued for clinical use. A repeat reactive donation (≥ 2 reactive results/3 performed tests) could not be issued for clinical use and the confirmation procedure was launched (neutralization test and/or individual donation test for HBV DNA). A positive result of the confirmation test indicated the presence of HBs antigen in the tested sample.

HBV DNA screening tests

HBV DNA testing was performed according to two alternative strategies: in individual donations (ID) or in plasma minipools (MP) of 24 (MP24), 8 (MP8), 6 (MP6) or 4 (MP4) donations.

In the article, the sensitivity of NAT tests and the test formats (IDT/pool) used for HBV detection in donor plasma was represented as 95% limit of detection (95% LoD) taking into account the dilution with pooled donations.

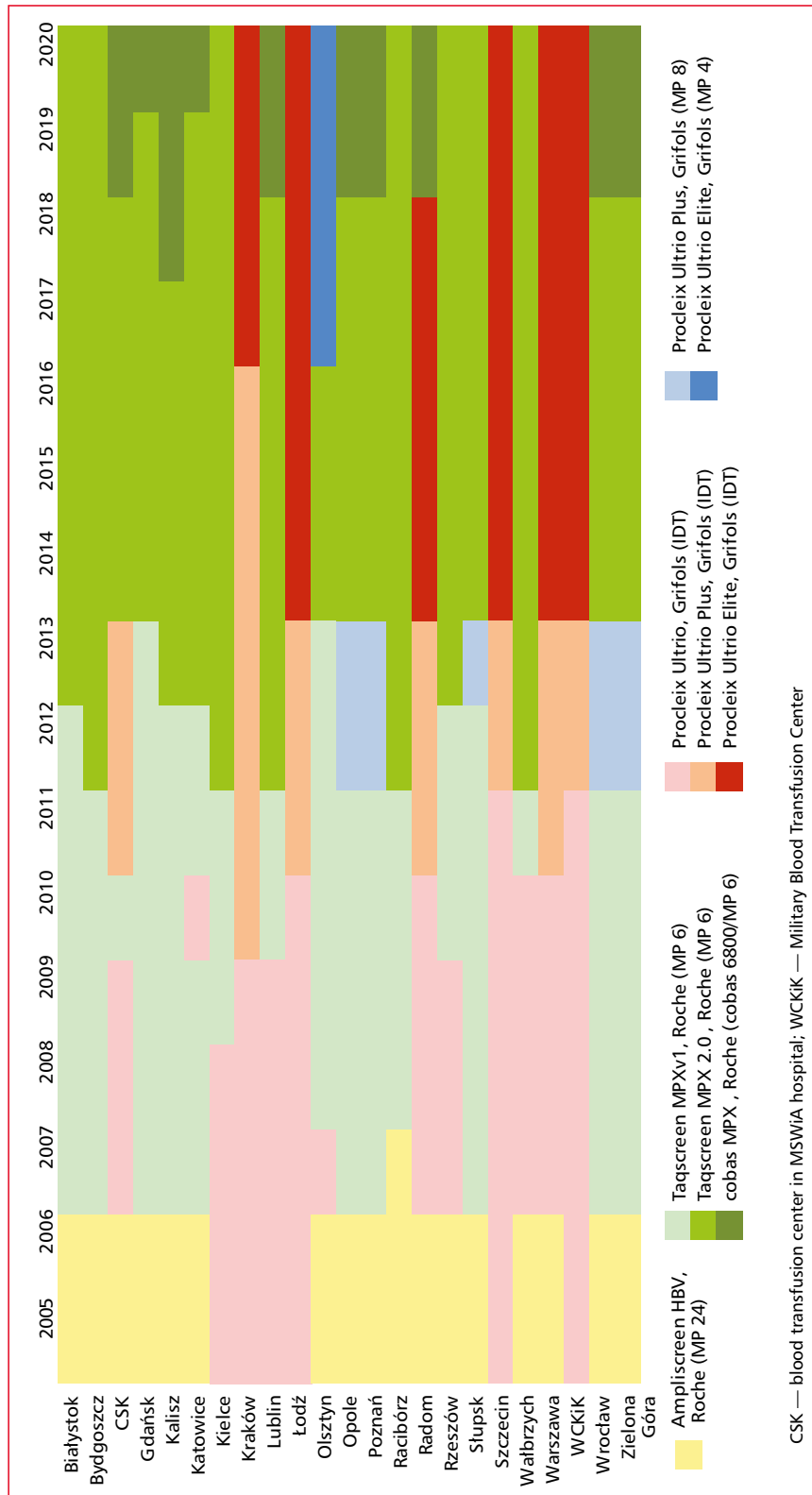


Figure 4. Methods of HBV DNA screening in Polish blood transfusion service (2005–2020)

Single donation screening was performed with TMA tests while PCR and TMA tests were used for pool testing (Fig. 4). 24-donation MPs were tested with Ampliscreen HBV test, which detected only HBV DNA. The remaining tests were multiplex, i.e. they allowed simultaneous detection of 3 viruses (HBV, HCV and HIV). Recognition of the detected virus required additional discriminatory testing (Table 1). Only 2/7 multiplex test (Taqscreen MPX2 and cobas MPX) were capable of identifying the detected virus.

Tests and systems of testing were selected by BTC according to current tender procedures and following 2011 guidelines for detection of 24 IU HBV DNA/ml in donation [47–48].

In 2005–2020, the sensitivity of PCR-based tests increased from 4.4 to 1.4 IU/ml and sensitivity for donation tested in pools from 105,6–8,4 IU/ml. In 2007 the increase in the sensitivity of PCR based test was brought about by the shift from Ampliscreen HBV (95% LOD 4.4 IU/ml) to Taqscreen MPXv1 (3.8 IU/ml) as well as reduction of plasma pool from 24 to 6 donations. In the years that followed, sensitivity of PCR-based tests performed in the MP6 was brought about by higher sensitivity of the subsequent versions of the MPX test. The sensitivity of the TMA-based tests varied from 2.1 to 10.4 IU/ml and sensitivity for donation tested in pools from 16,8–17,2 IU/ml. The sensitivity for donation screened by TMA based tests was subject to smaller changes than the PCR based tests, because until 2011 the former were performed only in single donations. Since 2011, the recommended test format (according to guidelines) had to detect 24 IU of HBV DNA in 1 ml of donation.

In the period 2005–2020, some BTC (Fig. 4) used tests produced by Gen-Probe Incorporated (San Diego, USA), based on TMA method (initially PROCLEIX ULTRIO Assay, and the subsequent versions: PROCLEIX ULTRIO PLUS Assay, PROCLEIX ULTRIO ELITE Assay). Others used only PCR based tests (Ampliscreen HBV) and real-time PCR (Taqscreen MPX v.1, Taqscreen MPX v.2, cobas MPX) by Roche Molecular Systems (South Branchburg, USA). Some BTC worked interchangeably with TMA and PCR based method.

In 2005–2006, HBV DNA donor screening was performed in single donations or 24 donation plasma pools. Since 2007, MP24 screening were successively replaced with single donation tests (sensitivity of 10.4 IU/ml — Ultrio test) or with 6 donation plasma pools. The change of test (from Ampliscreen to Taqscreen MPXv1) and pool size (from MP24 to MP6) induced change in screening

Table 1. Characteristics of DNA HBV screening in BTC and confirmatory test in BTC and IHTM (2005–2020)

Test (for screening, indirect, replicates)	Sensitivity of test* — 95% LOD (IU/ml)	Format	Sensitivity for donation — 95% LOD (IU/ml)	Necessity of indirect test or replicates/discriminatory test [95%LOD discriminatory test IU/ml]	Confirmation in IHTM for ID with results reactive:	Period of application
Ampliscreen HBV#	4.4	MP 24	105.6	4 subpools (MP6) if subpool (r) than ID/No	DNA HBV	2005–2007
Taqscreen MPXv1	3.8	MP 6	22.8	6 ID z MP6(r)/yes [4, 41]	Multiplex	2007–2011&
Taqscreen MPXv2	2.3	MP 6	13.8	6 ID z MP6(r)/No	DNA HBV	2012–2018
Cobas MPX	1.4	MP 6	8.4	6 ID z MP6(r)/No	DNA HBV	2019–2020
Ultrio (manual)	7.5	IDT	7.5	No/yes [8, 5]	Ultrio	2005–2006
Ultrio (Tigris)	10.4	IDT	10.4	2 x Ultrio/yes [11]	2Ultrio &/or min.1 Ultrio & dHBV	2007–2009
Ultrio Plus (Tigris)	2.1\$ (3,4^)	IDT	2.1 (3,4^)	2 x Ultrio/yes [2, 5]	2Ultrio &/or min.1 Ultrio & dHBV	2010–2013&
Ultrio Elite	4.3	IDT	4.3	IDT/yes [2, 5]	DNA HBV	2012–2013
				2 Ultrio/yes [4, 5]	2Ultrio &/or min.1 Ultrio & dHBV	2014–2020
				ID/yes [4, 5]	DNA HBV	2017–2020

(r)- reactive result, dHBV — discriminatory test for DNA HBV, &from 2011 national recommendations: screening test must detect 24 IU DNA HBV/ml; ID — Individual Donation; * sensitivity according to instruction; #test detecting only DNA HBV; \$based on the I version of test instruction; ^ based on the III version of Ultrio Plus test instruction

sensitivity from 105.6 IU/ml to 22.8 IU/ml. Since 2011, the Ultrio test has been gradually replaced with higher sensitivity (95% LOD = 2.1 IU/ml) Ultrio Plus. In the 2012–2014 period, donor samples from 4 BTC were tested in 8 donation pools using the Ultrio Plus test (sensitivity for donation 16.8 IU/ml). Since 2014, the Ultrio Plus test manufacturer reported slightly lower sensitivity as compared to previous values (3.4 vs. 2.1 IU/ml). Since 2012, the Taqscreen MPXv1 test was replaced with the Taqscreen MPXv2 test, which increased sensitivity from 22.8 IU/ml to 13.8 IU/ml for single donation screened in MP6. Since 2018, the Taqscreen MPX2 test was replaced by the cobas MPX test (sensitivity for single donation screened in MP6 increased from 13.8 IU/ml to 8.4 IU/ml). Since 2014, the Ultrio Plus test was replaced with Ultrio Elite test (sensitivity 4.3 IU/ml). Since 2017, some regional BTC used the Ultrio Elite test in 4 donation pools (sensitivity 17.2 IU/ml). Table 1 and Figure 4 present changes in the sensitivity of HBV DNA detection in donor screening. Reactive NAT result for donations negative in HBsAg test obliges the BTC and the IHTM to launch procedures to confirm or exclude infection in the reactive sample. The procedures are described later on in the text.

Procedures launched in BTC and in IHTM for reactive result of HBV DNA screening in HBsAg negative donations

In the case of reactive NAT result in plasma pool or individual donation, appropriate confirmation algorithms were followed. Each NAT reactive result in individual donation at the BTC (confirmation stage I) had to be confirmed at the IHTM (confirmation stage II) on plasma sample forwarded by the BTC. Over the period under analysis the algorithm implemented at BTC had undergone changes and was closely related to the screening methods (Fig. 5 and 6, Table 1).

Confirmation I stage in BTC

In the case of a reactive result with Ampliscreen HBV test performed in MP24, it was necessary to test 6 donation subpools and then individual donations in order to identify the HBV infected donor/donation. Plasma from HBV DNA reactive donations was sent to IHTM (a/on Fig. 5).

When minipools of 6 donation (MP6) were found reactive with multiplex PCR-based tests it was necessary to identify the positive donation (s) (b/and b'/on Fig. 5) with Taqscreen MPXv1,

Taqscreen MPX2 and cobas MPX tests. All MPX tests were multiplex, but only the Taqscreen MPX2 and cobas MPX tests recognized the identified virus. Plasma from HBV DNA reactive donations was sent to IHTM (b/on Fig. 5). The Taqscreen MPXv1 test did not identify the detected virus and a differential test for multiplex reactive donation had to be performed at IHTM (b/in Fig. 5).

In the case of TMA based tests, when a multiplex reactive result was obtained:

- With the Ultrio HCV, HBV, HIV test in a single donation (IDT) in the years 2005–2007 it was necessary to perform DNA HBV, RNA HIV and RNA HCV differentiating tests against viruses detected in the Ultrio test to identify the detected virus. The dHBV differential assay was used to identify HBV. All Ultrio reactive plasma samples were sent to IHTM for HBV confirmatory stage II except those with RNA HCV and/or RNA HIV positive and DNA HBV negative in differentiating tests (a/ Fig. 6). Such procedure was used because Ultrio test was more sensitive than dHBV test and HBV viremia can be very low, even below detection limit of dHBV test.
- In the years 2008–2011, for Ultrio HCV/HBV/HIV tests performed in individual donations (Ultrio Plus since 2011, Ultrio Elite since 2014), 5 tests had to be performed on the same sample: 2 replications of the multiplex test and 3 single differentiating test for each of the tested viruses dHBV, dHCV, dHIV. Plasma with min. 2 Ultrio reactive and/or min. 1 Ultrio and dHBV reactive results was sent to the IHTM (b/ Figure 6).
- In 2011–2020, for ULTRIO Plus/Elite HCV/HBV/HIV test performed in 8 or 4 donation pools, all donations in the reactive pool had to be tested individually with the Ultrio Plus/Elite HCV/HBV/HIV test, and then the reactive donation should be tested with a differential test. Plasma from donation dHBV reactive result was sent to IHTM (c/ Fig. 6).

Confirmation II stage in IHTM

Verification (confirmation tests) at IHTM were performed on biological material from a previously unopened sample or from plasma bag (Tab. 1; Figs 5 and 6). The tests were performed on donations found reactive in BTC with:

- a) IDT in tests
 - Ultrio (a/ Figure 6) regardless of the differentiation test result;
 - Ultrio Plus or Elite, but only for repeat reactive result in multiplex (screening) test and/or the differentiating test (b/ Fig. 6);

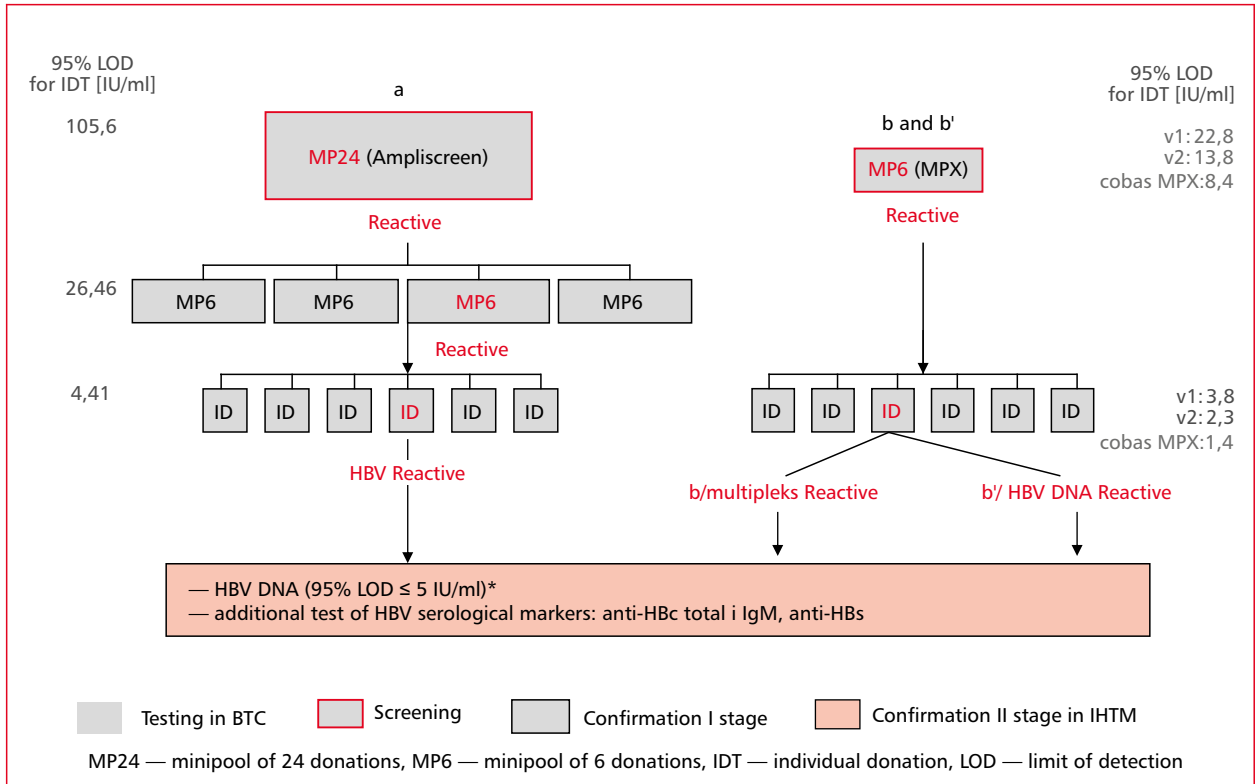


Figure 5. Procedure for reactive result in HBV DNA screening — PCR; *sensitivity according to instruction

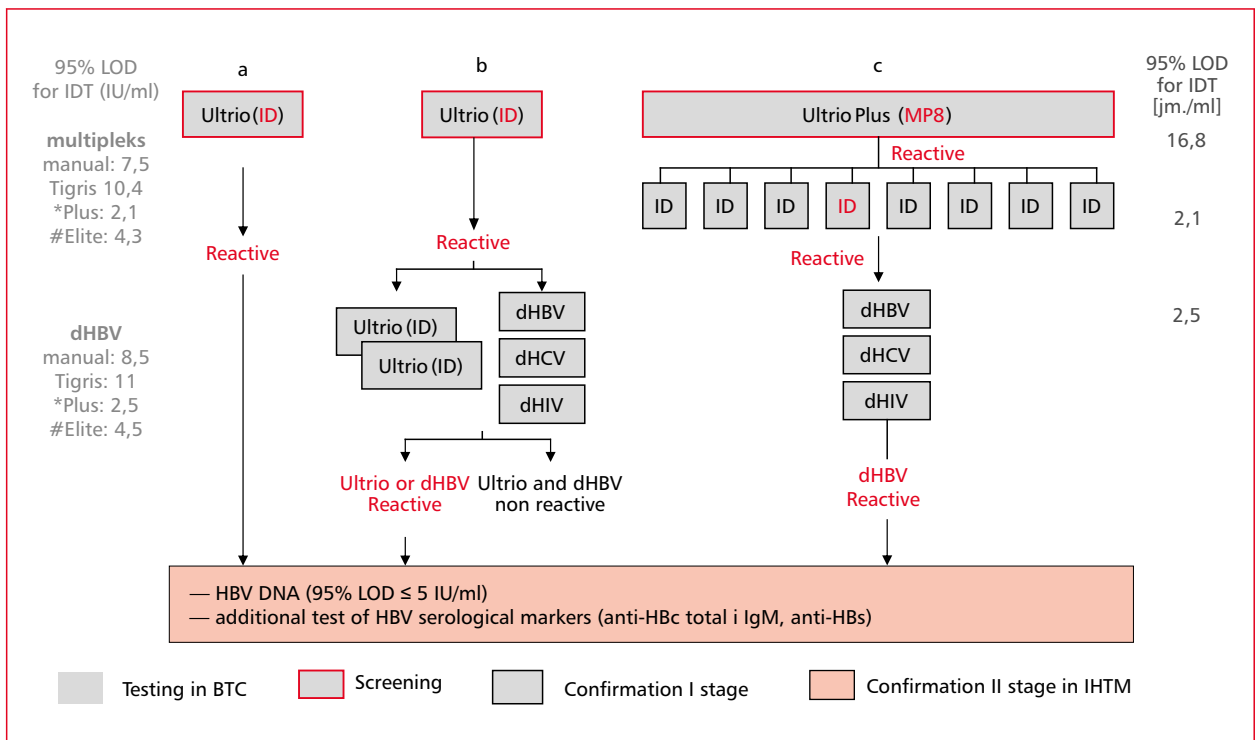


Figure 6. Procedure for reactive result in HBV DNA screening — TMA

- b) mini-pool tests with
 - Ampliscreen MP24 (a/Fig. 5);
 - Taqscreen MPXv1 (b/Fig. 5), Taqscreen MPXv2 and cobas MPX (b'/Fig. 5) MP6;
 - Ultrio Plus MP8 (c/Fig. 6), Ultrio Elite MP4.

Verification tests performed at IHTM to identify HBV infection included HBV DNA assays with sensitivity < 5 IU/ml (Ampliscreen HBV, Ultrio Plus, Ultrio Elite and GFE Blut, Germany) as well as anti-HBc total, anti-HBc IgM and anti-HBs serological markers (Architect, Abbott Diagnostics, Germany). The presence of individual markers in a donation found reactive in BTC allowed to determine the phase of donor infection (I, II WP or OBI) and to forward the notification to the donor together with referral to primary care physician.

Present and Future of HBV screening in blood donors

Serologic HBsAg tests have been performed since the 1970s. In 2016, 44/46 European countries and 176/180 countries worldwide reported HBsAg screening to WHO [1].

Since 1999, HBV nucleic acid testing (NAT) has gradually been added to the panel of tests in routine use [1, 49]. In 2016, HBV DNA testing was performed in the countries of: Europe (n = 22), North and South America (n = 4), Africa (n = 2), the Middle East (n = 5), the Western Pacific (n = 7) and South-East Asia (n = 2). In Poland as worldwide molecular screening tests are PCR and TMA-based and performed either in individual donations (IDT) or mini-pools (MP) [49]. Since 2017, the NAT screening tests recommended by the European Commission must be capable of detecting at least 100 IU of HBV DNA/ml per donation regardless of the adopted strategy [7]. Each country selects its own testing approach/strategy (IDT or MP) as well as the mini-pool size (MP4–MP96); the choice depends upon epidemiological and economic analyses and the decisions are incorporated into national recommendations for the country's blood transfusion service [50, 51].

Countries with a history of HBV epidemics and obligatory neonatal hepatitis B vaccination record a steady decline of HBsAg-positive infection rate. No such reports are available for occult hepatitis B infections [52–55]. Outcome of HBV DNA screening demonstrates that higher sensitivity tests ensure more effective yield rate for OBI and WP infections [53, 56, 57]. On the other hand, anti-HBc tests are capable of detecting both HBsAg-positive as well as occult anti-HBc-positive

infections. Due to very low viral load and level-fluctuations OBI are more difficult to detect with HBV DNA tests [9, 58]. In view of the above, there are ongoing disputes regarding the selection of an optimal screening panel for blood donors. In the USA, parallel testing of HBV DNA in MP-16 (sensitivity of 68.8 IU/ml) and anti-HBc was found more effective than HBV DNA in MP-16 and HBsAg [9]. In the Republic of South Africa, the ID-NAT test alone was found more effective for reduction of the HBV transmission risk than MP (6–16) NAT in combination with HBsAg and anti-HBc tests in all donations, particularly with regard to regular donors. Similar yield was determined for first-time donors. The South African analyses presented at the 2019 Conference of International Plasma Fractionation Association (IPFA) demonstrate that the effectiveness of screening panels/strategies correlates mainly with test sensitivity while the impact of regional epidemics and incidence rate is merely marginal [Vermeulen M, IPFA, 2019]. The above suggests a variety of optimal testing strategies and no one, single universal approach. A separate strategy for Poland should therefore be developed.

In order to determine an optimal panel for HBV testing in Polish blood donors it is essential to perform analyses of the detection frequency for HBsAg and HBV DNA with the strategies used so far as well as risk calculation with each approach and test, including anti-HBc which has not as yet been used for donor screening. This is planned as the focal point of our next study.

Acknowledgements

The authors express their sincere gratitude to mgr Dorota Kubicka-Russel for her help in data processing.

References

1. Global Hepatitis Report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017.
2. Kleinman SH, Lelie N, Busch MP. Infectivity of human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus and risk of transmission by transfusion. *Transfusion*. 2009; 49(11): 2454–2489, doi: [10.1111/j.1537-2995.2009.02322.x](https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02322.x), indexed in Pubmed: [19682345](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19682345/).
3. Liang T. Hepatitis B: The virus and disease. *Hepatology*. 2009; 49(S5): S13–S21, doi: [10.1002/hep.22881](https://doi.org/10.1002/hep.22881), indexed in Pubmed: [19399811](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19399811/).
4. Liaw YF, Chu CM. Hepatitis B virus infection. *The Lancet*. 2009; 373(9663): 582–592, doi: [10.1016/s0140-6736\(09\)60207-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(09)60207-5).
5. Allain J-P. Global epidemiology of occult HBV infection. *Home*. 2017; 2(5), doi: [10.21037/aob.2017.06.01](https://doi.org/10.21037/aob.2017.06.01).
6. DIRECTIVE 2002/98/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 27 January 2003 setting standards

- of quality and safety for the collection, testing, processing, storage and distribution of human blood and blood components and amending Directive. 2001/83/EC.
7. Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components, 19th Edition 2017. <https://www.edqm.eu/en/blood-transfusion-guide>.
 8. Janssen M.P. The collection, testing and use of blood and blood components in Europe 2015 report. <https://www.edqm.eu/en/blood-transfusion-reports-70.html#2015>.
 9. Dodd RY, Nguyen ML, Krysztof DE, et al. Blood donor testing for hepatitis B virus in the United States: is there a case for continuation of hepatitis B surface antigen detection? *Transfusion*. 2018; 58(9): 2166–2170, doi: [10.1111/trf.14784](https://doi.org/10.1111/trf.14784), indexed in Pubmed: [30144082](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30144082/).
 10. Seed C, Allain J, Lozano M, et al. International Forum on Occult hepatitis B infection and transfusion safety. *Vox Sanguinis*. 2019; 114(4): e1–e35, doi: [10.1111/vox.12743](https://doi.org/10.1111/vox.12743).
 11. Tsai KN, Kuo CF, Ou JHJ. Mechanisms of Hepatitis B Virus Persistence. *Trends Microbiol*. 2018; 26(1): 33–42, doi: [10.1016/j.tim.2017.07.006](https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.07.006), indexed in Pubmed: [28823759](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28823759/).
 12. Hong M, Bertoletti A. Tolerance and immunity to pathogens in early life: insights from HBV infection. *Semin Immunopathol*. 2017; 39(6): 643–652, doi: [10.1007/s00281-017-0641-1](https://doi.org/10.1007/s00281-017-0641-1), indexed in Pubmed: [28685270](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28685270/).
 13. Yoshikawa A, Gotanda Y, Itabashi M, et al. Japanese Red Cross NAT Screening Research Group. HBV NAT positive [corrected] blood donors in the early and late stages of HBV infection: analyses of the window period and kinetics of HBV DNA. *Vox Sang*. 2005; 88(2): 77–86, doi: [10.1111/j.1423-0410.2005.00602.x](https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2005.00602.x), indexed in Pubmed: [15720604](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15720604/).
 14. Vermeulen M, Dickens C, Lelie N, et al. Hepatitis B virus transmission by blood transfusion during 4 years of individual-donation nucleic acid testing in South Africa: estimated and observed window period risk. *Transfusion*. 2012; 52(4): 880–892, doi: [10.1111/j.1537-2995.2011.03355.x](https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03355.x), indexed in Pubmed: [21981386](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21981386/).
 15. Trépo C, Chan H, Lok A. Hepatitis B virus infection. *The Lancet*. 2014; 384(9959): 2053–2063, doi: [10.1016/s0140-6736\(14\)60220-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(14)60220-8).
 16. Juszczyk J. Clinical course and consequences of hepatitis B infection. *Vaccine*. 2000; 18 Suppl 1: S23–S25, doi: [10.1016/s0264-410x\(99\)00457-0](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(99)00457-0), indexed in Pubmed: [10683539](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10683539/).
 17. Tu T, Budzinska MA, Shackel NA, et al. HBV DNA Integration: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Viruses*. 2017; 9(4), doi: [10.3390/v9040075](https://doi.org/10.3390/v9040075), indexed in Pubmed: [28394272](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28394272/).
 18. Hu B, Wang R, Fu J, et al. Integration of hepatitis B virus S gene impacts on hepatitis B surface antigen levels in patients with antiviral therapy. *J Gastroenterol Hepatol*. 2018; 33(7): 1389–1396, doi: [10.1111/jgh.14075](https://doi.org/10.1111/jgh.14075), indexed in Pubmed: [29266382](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29266382/).
 19. Raimondo G, Caccamo G, Filomia R, et al. Occult HBV infection. *Semin Immunopathol*. 2013; 35(1): 39–52, doi: [10.1007/s00281-012-0327-7](https://doi.org/10.1007/s00281-012-0327-7), indexed in Pubmed: [22829332](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22829332/).
 20. Lampertico P, Agarwal K, Berg T, et al. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 2017; 67(2): 370–398, doi: [10.1016/j.jhep.2017.03.021](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.03.021).
 21. Seto WK, Lo YR, Pawlotsky JM, et al. Chronic hepatitis B virus infection. *The Lancet*. 2018; 392(10161): 2313–2324, doi: [10.1016/s0140-6736\(18\)31865-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)31865-8).
 22. Korelitz JJ, Busch MP, Kleinman SH, et al. A method for estimating hepatitis B virus incidence rates in volunteer blood donors. National Heart, Lung, and Blood Institute Retrovirus Epidemiology Donor Study. *Transfusion*. 1997; 37(6): 634–640, doi: [10.1046/j.1537-2995.1997.37697335159.x](https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1997.37697335159.x), indexed in Pubmed: [9191825](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9191825/).
 23. Scheiblauer H, El-Nageh M, Diaz S, et al. Performance evaluation of 70 hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) assays from around the world by a geographically diverse panel with an array of HBV genotypes and HBsAg subtypes. *Vox Sang*. 2010; 98(3 Pt 2): 403–414, doi: [10.1111/j.1423-0410.2009.01272.x](https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2009.01272.x), indexed in Pubmed: [20412171](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20412171/).
 24. Shinkai N, Kusumoto S, Murakami S, et al. Novel monitoring of hepatitis B reactivation based on ultra-high sensitive hepatitis B surface antigen assay. *Liver Int*. 2017; 37(8): 1138–1147, doi: [10.1111/iv.13349](https://doi.org/10.1111/liv.13349), indexed in Pubmed: [27992664](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27992664/).
 25. Deguchi M, Kagita M, Yoshioka N, et al. Evaluation of the highly sensitive chemiluminescent enzyme immunoassay „Lumpulse HBsAg-HQ” for hepatitis B virus screening. *J Clin Lab Anal*. 2018; 32(4): e22334, doi: [10.1002/jcla.22334](https://doi.org/10.1002/jcla.22334), indexed in Pubmed: [28984383](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28984383/).
 26. Pondé RAA. Atypical serological profiles in hepatitis B virus infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013; 32(4): 461–476, doi: [10.1007/s10096-012-1781-9](https://doi.org/10.1007/s10096-012-1781-9), indexed in Pubmed: [23192489](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23192489/).
 27. Hsu HY, Chang MH, Ni YH, et al. Chronologic changes in serum hepatitis B virus DNA, genotypes, surface antigen mutants and reverse transcriptase mutants during 25-year nationwide immunization in Taiwan. *J Viral Hepat*. 2017; 24(8): 645–653, doi: [10.1111/jvh.12687](https://doi.org/10.1111/jvh.12687), indexed in Pubmed: [28182307](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28182307/).
 28. Candotti D, Laperche S. Hepatitis B Virus Blood Screening: Need for Reappraisal of Blood Safety Measures? *Front Med (Lausanne)*. 2018; 5: 29, doi: [10.3389/fmed.2018.00029](https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00029), indexed in Pubmed: [29515997](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29515997/).
 29. Vermeulen M, van Drimmelen H, Coleman C, et al. A mathematical approach to estimate the efficacy of individual-donation and minipool nucleic acid amplification test options in preventing transmission risk by window period and occult hepatitis B virus infections. *Transfusion*. 2014; 54(10): 2496–2504, doi: [10.1111/trf.12657](https://doi.org/10.1111/trf.12657), indexed in Pubmed: [24749834](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24749834/).
 30. Zhang ZH, Wu CC, Chen XW, et al. Genetic variation of hepatitis B virus and its significance for pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2016; 22(1): 126–144, doi: [10.3748/wjg.v22.i1.126](https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i1.126), indexed in Pubmed: [26755865](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26755865/).
 31. Brojer E, Grabarczyk P, Liszewski G, et al. Polish Blood Transfusion Service Viral Study Group. Characterization of HBV DNA+/HBsAg- blood donors in Poland identified by triplex NAT. *Hepatology*. 2006; 44(6): 1666–1674, doi: [10.1002/hep.21413](https://doi.org/10.1002/hep.21413), indexed in Pubmed: [17133474](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17133474/).
 32. Candotti D, Grabarczyk P, Ghiazza P, et al. Characterization of occult hepatitis B virus from blood donors carrying genotype A2 or genotype D strains. *J Hepatol*. 2008; 49(4): 537–547, doi: [10.1016/j.jhep.2008.04.017](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.04.017), indexed in Pubmed: [18602718](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18602718/).
 33. Grabarczyk P, Garmiri P, Liszewski G, et al. Polish Blood Transfusion Centres Viral Study Group. Molecular and serological characterization of hepatitis B virus genotype A and D infected blood donors in Poland. *J Viral Hepat*. 2010; 17(6): 444–452, doi: [10.1111/j.1365-2893.2009.01192.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2009.01192.x), indexed in Pubmed: [19780948](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19780948/).
 34. Lelie N, Bruhn R, Busch M, et al. International NAT Study Group. Detection of different categories of hepatitis B virus (HBV) infection in a multi-regional study comparing the clinical sensitivity of hepatitis B surface antigen and HBV-DNA testing. *Transfusion*. 2017; 57(1): 24–35, doi: [10.1111/trf.13819](https://doi.org/10.1111/trf.13819), indexed in Pubmed: [27673757](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27673757/).

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

Hemafereza lecznicza w świetle danych przedstawionych w czasie 36. Międzynarodowego Kongresu ISBT (kongres wirtualny, 12–16 grudnia 2020 r.). Cześć II — cytaferaza lecznicza

Therapeutic hemapheresis in light of the presentations at the 36th International ISBT Congress Virtual meeting, 12–16 December 2020.
Part II — therapeutic cytaferesis

Aleksandra Rosiek 

Zakład Transfuzjologii Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

Streszczenie

W ramach 36. Międzynarodowego Kongresu ISBT (kongres wirtualny, 12–16 grudnia 2020 r.) hemaferezie leczniczej poświęcono łącznie 22 doniesienia omawiające różne aspekty stosowania tej metody leczniczej. Przedstawiono dane dotyczące wykorzystania wybranych technik hemaferezy w niektórych chorobach i stanach klinicznych.

Najwięcej doniesień (8) pochodziło z Hiszpanii (w tym jedno we współpracy z USA), po 2 z Korei i ze Sri Lanki. Przedstawiono również pojedyncze doniesienia z Polski, Wielkiej Brytanii, Indii, Meksyku, Omanu, Bangladeszu, Argentyny i Izraela.

Większość doniesień (14) poświęcono zagadnieniom związanym ze stosowaniem plazmaferezy leczniczej — między innymi w neurologii i w przypadkach zakrzepowej płamicy małopłytkowej.

Niniejsza (druga) część sprawozdania jest poświęcona prezentacjom dotyczącym cytaferazy leczniczej, natomiast doniesienia na temat plazmaferezy leczniczej zostały przedstawione w części pierwszej.

Słowa kluczowe: hemafereza lecznicza, cytaferaza, leukaferaza, trombaferaza, fotofereza

J. Transf. Med. 2021; 14: 87–92

Wstęp

W ramach 36. Międzynarodowego Kongresu ISBT (kongres wirtualny, 12–16 grudnia 2020 r.), hemaferezie leczniczej poświęcono część sesji plakatowej obejmującej zagadnienia z zakresu transfuzjologii klinicznej, a także część sesji dotyczącej prezentacji

wyników badań klinicznych. Ponadto doniesienia na temat fotoferezy były przedstawiane w sesjach poświęconych zastosowaniu terapii komórkowych.

Prezentacje poszczególnych prac zostały umieszczone na stronie internetowej kongresu w postaci filmów zawierających slajdy z nagraniem komentarzem autorskim.

Adres do korespondencji: dr n. med. Aleksandra Rosiek, Zakład Transfuzjologii Instytutu Hematologii i Transfuzjologii, ul. I. Gandhi 14, 02–776 Warszawa, tel.: 22 349 63 91, faks: 22 349 63 76, e-mail: arosiek@ihit.waw.pl

Opracowano na podstawie: *Vox Sanguinis* 2020; 115 (supl. 1): 3–387

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

Przedstawiono łącznie 22 doniesienia omawiające różne aspekty stosowania hemaferazy leczniczej w niektórych chorobach i stanach klinicznych, przy czym:

- w 14 doniesieniach poruszano zagadnienia związane ze stosowaniem plazmaferazy;
- 1 doniesienie dotyczyło erytroaferezy;
- 1 doniesienie poświęcono zastosowaniu leukaferazy;
- 1 doniesienie dotyczyło wieloletnich doświadczeń autorów związanych ze stosowaniem różnych technik aferezy leczniczej;
- 5 doniesień obejmowało temat fotoferezy.

Najwięcej doniesień (8) pochodziło z Hiszpanii (w tym jedno we współpracy z Stanami Zjednoczonymi), po 2 z Korei i ze Sri Lanki. Przedstawiono również pojedyncze doniesienia z Polski, Wielkiej Brytanii, Indii, Meksyku, Omanu, Bangladeszu, Argentyny i Izraela.

Niniejsza część sprawozdania poświęcona jest zastosowaniom cytaferazy leczniczej, natomiast doniesienia na temat plazmaferazy leczniczej zostały przedstawione w części pierwszej niniejszego sprawozdania [1].

Doświadczenia związane ze stosowaniem cytaferazy leczniczej w różnych stanach klinicznych

W doniesieniu pochodzącym z Polski (Rosiek i wsp.) przedstawiono dane dotyczące zabiegów hemaferazy wykonanych w latach 1997–2017 w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii (IHiT) w Warszawie [2]. Analizowano wskazania do zabiegów, ich liczbę w poszczególnych latach, a także kategorię przypisywaną danemu zastosowaniu hemaferazy według zaleceń Amerykańskiego Stowarzyszenia Aferezy (ASFA, *American Society for Apheresis*) [3].

W omawianym okresie wykonano łącznie 3635 zabiegów u 778 pacjentów, w tym 717 zabiegów leukaferazy u 286 pacjentów, 97 zabiegów trombaferazy u 38 pacjentów i 79 zabiegów fotoferezy u 7 pacjentów (dane dotyczące zabiegów plazmaferazy zostały przedstawione w części pierwszej niniejszego sprawozdania) [1].

Zabiegi w IHiT wykonano głównie u pacjentów z chorobami układu krwiotwórczego. Zabiegi leukaferazy przeprowadzano w celu wyeliminowania nadmiaru leukocytów w przebiegu białaczki, zarówno w stanach leukostazy, jak i profilaktycznie, natomiast zabiegi trombaferazy — w celu eliminacji nadmiaru płytek krwi u chorych z trombocytozą.

Poczynając od grudnia 2016 roku, wykonywano zabiegi fotoferezy u pacjentów z chorobą przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD, *graft-versus-host disease*) po przeszczepieniu krwiotwórczych komórek macierzystych.

Większość z tych zabiegów spełniała kryteria wskazań do stosowania hemaferazy według wytycznych ASFA, chociaż nie zawsze były to zalecenia I kategorii¹.

Zabiegi były na ogół dobrze tolerowane, a obserwowane niepożądane reakcje dotyczyły łagodnych reakcji wazowagalnych i objawów hipokalcemii, a także problemów z dostępem naczyniowym.

Autorzy stwierdzają, że hemaferaza lecznicza, w tym cytaferaza, jest przede wszystkim zabiegiem o działaniu wspomagającym i paliatywnym, służącym najczęściej do szybkiej eliminacji czynników chorobotwórczych z krążenia. Warto jednak zauważyć, że zabiegi te są zawsze kosztowne i związane z pewnym ryzykiem dla pacjenta, należy je zatem stosować z należytą rozważą, po przeprowadzeniu odpowiedniej oceny klinicznej.

Erytroafereza lecznicza

Erytroafereza jest techniką aferezy polegającą na automatycznej separacji krwinek czerwonych chorego i zastąpieniu ich koncentratem krwinek czerwonych (KKCz) dawcy lub płynem zastępczym. Erytroaferezie poświęcono w czasie sesji plakatowej jedno doniesienie, omawiające jej zastosowanie w leczeniu niedokrwistości sierpowatokrwinkowej.

W badaniu Martinez Lázaro i wsp. (Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Saragossa, Hiszpania) omówiono zagadnienia związane z leczeniem 4-letniego chłopca z niedokrwistością sierpowatokrwinkową [4]. W sierpniu 2018 roku chłopiec przeżył udar niedokrwienny lewej tętnicy środkowej mózgu. W okresie od września 2018 roku do stycznia 2020 roku u dziecka wykonano łącznie 7 zabiegów erytroaferezy. Obserwowano problemy dotyczące dostępu żylnego, co wiązało się z koniecznością przerywania serii zabiegów i stosowania portu naczyniowego. W okresach, gdy nie wykonywano erytroaferezy, chłopiec otrzymywał przetoczenia KKCz, co jednak doprowadziło u niego do przeciężenia żelazem i w konsekwencji do konieczności zastosowania leków chelatujących żelazo.

¹Według wskazań ASFA z 2019 r. wyróżniano cztery kategorie zaleceń do zabiegu aferezy leczniczej:

- Kategoria I — afereza jako terapia pierwszego rzutu, stosowana samodzielnie lub w połączeniu z innymi metodami leczenia.
- Kategoria II — afereza jako terapia drugiego rzutu, stosowana samodzielnie lub w połączeniu z innymi metodami leczenia.
- Kategoria III — optymalne zastosowania aferezy nieustalone, decyzje należy podejmować indywidualnie.
- Kategoria IV — opublikowano dowody na brak skuteczności lub szkodliwość aferezy.

W okresie, gdy stosowano aferezę, poziom hemoglobiny S u pacjenta utrzymywał się przed zabiegami na poziomie 35,1%, a po erytroferizie — 10,4%, przy wartości Hct < 35%. W chwili zgłaszania doniesienia stan pacjenta był stabilny, a przeciążenie żelazem ulegało zmniejszeniu; nie stwierdzono alloimmunizacji.

Autorzy stwierdzają, że erytroferiza wykonywana u dzieci z niedokrwistością sierpowatokrwinkową jest zabiegiem bezpiecznym i skutecznym. Stosując ją jednak w praktyce klinicznej, należy dysponować odpowiednimi procedurami, związanymi z koniecznością zapewnienia dostępu do żył obwodowych.

Leukaferiza lecznicza

Jako najczęstsze wskazanie do zabiegu leukaferizacji, tj. zabiegu mającego na celu separację metodą aferezy leukocytów pacjenta, wymieniana jest w piśmiennictwie światowym redukcja nadmiaru leukocytów u chorych z białaczką.

Założeniem badania opisanego przez Lee i wsp. (Seoul St. Mary's Hospital, Seul, Republika Korei) była ocena skutków stosowania leukaferizacji u pacjentów z różnymi rodzajami białaczek [5].

W tym celu wybrano do badania 319 pacjentów z nowo rozpoznaną ostrą białaczką (z wyłączeniem ostrej białaczki promielocytowej), przechodzących zabiegi leukaferizacji w latach 2009–2018, i dokonano ich kwalifikacji zgodnie z klasyfikacją Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) z 2016 roku. Byli to pacjenci z pierwotną ostrą białaczką szpikową — 200 osób; z wtórną białaczką szpikową — 12 osób; z ostrą białaczką limfoblastyczną — 97 osób, oraz 10 pacjentów z ostrą białaczką o mieszanym fenotypie. Średnia początkowa liczba leukocytów u pacjentów wynosiła od 152,5 do $263,7 \times 10^9/l$.

Skuteczność leukaferizacji oceniano na podstawie uzyskanego zmniejszenia bezwzględnej liczby leukocytów. Wyróżniono dwie grupy pacjentów — o większym stopniu cytoredukcji (53 osoby; średni czas przeżycia 1187 dni) i o mniejszym stopniu (266 osób; średni czas przeżycia 1753 dni), $p = 0,042$. W grupie pacjentów z ostrą białaczką szpikową średnie wartości czasu przeżycia w wymienionych grupach wynosiły odpowiednio 1023 i 1759 dni, a u pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną — 946 i 1781 dni.

Autorzy wnioskują, że całkowity czas przeżycia pacjentów z ostrą białaczką był odwrotnie proporcjonalny do uzyskanej redukcji liczby leukocytów, co prawdopodobnie odzwierciedla podstawową

patobiologię białaczki. Jednak wskazane wydaje się przeprowadzenie dalszych badań.

Fotofereza

Fotofereza (ECP, extracorporeal photopheresis) jest ważną metodą terapii komórkowej. Międzynarodowy standard wykonania fotoferezy przewiduje pobranie limfocytów pacjenta metodą leukaferizacji, dodanie do nich *ex vivo* fotouczulacza (8-metoksypsoralen), a następnie naświetlenie ich ultrafioletem A i przetoczenie zwrótnie pacjentowi. Mechanizm działania ECP nie jest jeszcze w pełni poznany. Przypuszcza się jednak, że podstawową rolę odgrywa w nim indukcja apoptozy komórek.

Podstawowe metody wykonywania fotoferezy to:

- metoda online albo jednostopniowa (w zintegrowanym, zamkniętym systemie),
- metoda offline albo dwustopniowa [(przy użyciu separatora komórkowego i oddzielnego urządzenia do naświetlania promieniowaniem ultrafioletowym A (UVA, *ultraviolet A rays*)].

Większość prezentowanych w czasie kongresu doniesień dotyczących różnych aspektów stosowania fotoferezy pochodziła z Hiszpanii (4 doniesienia), jedno natomiast z Izraela.

Pierwsza z prac poświęconych fotoferezie (Navarro i wsp.) pochodziła z Hiszpanii (Hospital La Fe, Walencja) [6]. Autorzy oceniali wykonalność i skuteczność stosowania fotoferezy u pacjentów pediatrycznych, u których po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych wystąpiła choroba przeszczep przeciwko biorcy (TA-GvHD, *transfusion-associated graft-versus-host disease*). Wykonywanie zabiegów u dzieci wiąże się ze szczególnymi problemami ze względu na mniejszą całkowitą objętość krwi chorego, utrudniony dostęp żylny, brak współpracy i nieraz większe ryzyko powikłań.

Badaniem objęto pacjentów w wieku poniżej 18 lat. W latach 2013–2015 stosowano jednostopniową metodę fotoferezy, wykonując dwie sesje ECP w tygodniu (ostra GvHD) lub co dwa tygodnie (przewlekła GvHD). Poczynając od 2016 roku, stosowano metodę dwustopniową, wykonując dwie sesje ECP w tygodniu (ostra GvHD) lub raz w tygodniu (przewlekła GvHD), a następnie jedną sesję co dwa tygodnie. Pacjenci z masą ciała < 25 kg otrzymywali dożylnie wapń, a system aferezy wypełniano przed zabiegiem krwią. W 85% przypadków zastosowano centralny cewnik żylny.

Wykonano łącznie 516 sesji ECP podczas 27 epizodów leczenia u 23 pacjentów (2 pacjentów

miało 3 epizody), w wieku od 1 do 16 lat (mediana 8 lat), o masie ciała od 8 do 86 kg (mediana 29 kg). Mediana liczby sesji na pacjenta wynosiła 16 (zakres 2–47), a mediana czasu stosowania zabiegów — 5 miesięcy (zakres 0,25–15). Połowę zabiegów wykonano u pacjentów o masie ciała < 25 kg (n = 262). Wskazaniem do leczenia była przewlekła GvHD w 10 przypadkach (37%), a w pozostałych — ostra GvHD [obejmująca skórę (23/27; 85%), jelita (10/27; 37%) i wątrobę (6/27; 22%)].

Wydajność zbierania limfocytów była wyższa w trybie offline (49% vs. 40%). Większość problemów obserwowanych podczas zabiegów była związana z dysfunkcją centralnego cewnika żylnego (70/516; 13%), ale tylko 3 sesje musiały zostać przerwane. Pozostałe incydenty to lekka hipokalcemia (n = 8; 1,5%), niedokrwistość związana z ECP (n = 7; 1,3%), problemy techniczne (n = 6; 1%) i niedociśnienie (n=1).

Dwóch pacjentów zmarło przed zakończeniem pierwszego miesiąca leczenia. Pozostali wykazali pod koniec leczenia odpowiedź całkowitą (32%), częściową (32%) lub brak odpowiedzi (36%).

Autorzy wnioskują, że stosowanie zabiegów ECP jest wykonalne i bezpieczne, nawet w przypadku małych dzieci. Pomimo ograniczeń związanych z opisywanym badaniem odpowiedź zaobserwowano u 64% pacjentów; ECP należy zatem rozważyć jako opcję leczenia GvHD u każdego dziecka.

Autorzy następnego doniesienia pochodzącego z Hiszpanii (Paciello Coronel i wsp.; Hospital 12 de Octubre, Madryt) opisują wyniki zastosowania badania kinetyki apoptozy indukowanej procedurą ECP jako testu umożliwiającego biologiczną walidację ECP [7]. W tym celu oceniano ilościowo wczesną i późną apoptozę występującą po zabiegach w porównaniu z apoptozą komórek nie poddawanych ECP. Fotoferezę wykonywano metodą offline, przy użyciu separatora komórkowego i oddzielnego urządzenia do naświetlania UVA. Badanie obejmowało 8 zabiegów ECP u 5 pacjentów.

Badania kinetyki apoptozy wykazały istnienie znaczącej różnicy odsetka komórek apoptotycznych w próbkach pobranych przed i po ECP, a także 48 godzin po zabiegu. Autorzy wnioskują, że ocena apoptozy jest przydatną metodą walidacji procedur ECP, jakkolwiek ze względu na małą liczbę przeanalizowanych zabiegów opinia ta wymaga jeszcze potwierdzenia.

Trzecia praca pochodząca z Hiszpanii (Fernández Rodriguez i wsp.; Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo) omawiała zastosowanie fotoferezy w leczeniu zespołu Sézary'ego (SS,

Sézary syndrome) i erythrodermicznej postaci ziarniniaka grzybiastego (e-MF, *erythrodermic mycosis fungoides*) [8]. Niektóre z aktualnych wytycznych zalecają stosowanie ECP w leczeniu erythrodermicznej postaci pierwotnie skórnych chłoniaków T-komórkowych (E-CTCL, *erythrodermic primary cutaneous T-cell lymphoma*). Jednak poziom dostępnych dowodów jest niski, brakuje kontrolowanych badań klinicznych z randomizacją, a wyniki analiz przedstawiane przez poszczególnych autorów są bardzo zróżnicowane.

Autorzy opisali swoje doświadczenia związane ze stosowaniem ECP u pacjentów z SS i e-MF, poczynając od 2015 roku. W tym okresie zabiegi wykonano u 8 pacjentów w wieku od 48 do 76 lat. U 6 pacjentów (75%) stwierdzono SS w zaawansowanym stadium, a u 2 — e-MF. Dla większości pacjentów (62,5%) ECP stanowiło terapię pierwszego rzutu; 5 pacjentów otrzymało leczenie dodatkowe (kortykosteroidy, interferon, gemcytabina, metotreksat i chemioterapia). Tylko u 2 pacjentów stwierdzono adenopatię lub splenomegalię, u 7 chorych głównym objawem była erytrodemia.

Średnia liczba zabiegów ECP przypadająca na jednego pacjenta wyniosła 13,87 (4–24). Częściowe złagodzenie objawów skórnych zaobserwowano u 3 pacjentów (37,5%), przy średniej liczbie zabiegów wykonanych w tej grupie 21,33. U chorych nie wykazujących reakcji zabiegi zakończono wcześniej. Nie obserwowano powikłań związanych z ECP, jakkolwiek u jednego z pacjentów wykryto zakażenie centralnego cewnika żylnego.

Autorzy oceniają bezpieczeństwo i tolerancję ECP jako bardzo dobre. Uzyskany odsetek odpowiedzi był podobny do opisywanego poprzednio u chorych z erytrodemią, jednak nie uzyskano pełnej odpowiedzi. Znaczny procent pacjentów wykazywał ogólnoustrojową progresję pomimo poprawy objawów skórnych, być może dlatego, że ECP wykonywano w zaawansowanych stadiach choroby. Autorzy stwierdzają, że seria ocenianych zabiegów była krótka, jednak potwierdza wskazanie, aby zastosowanie ECP u pacjentów z SS/e-MF, u których występują objawy skórne, rozważyć na jak najwcześniejszym etapie leczenia.

W ostatniej pracy pochodzącej z Hiszpanii (Medina Guerrero i wsp.; Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca) omówiono wyniki stosowania ECP w leczeniu przewlekłej GvHD (cGvHD, *chronic graft-versus-host disease*) po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych [9]. Jest to opisowe badanie retrospektywne prze-

prorowadzone w szpitalu Universitari Son Espases w okresie od lutego 2015 do stycznia 2020. W ramach tego badania analizowano dane kliniczne i biologiczne 11 pacjentów z różnymi chorobami hematologicznymi w wieku od 20 do 69 lat. Do oceny nasilenia cGvHD wykorzystano skalę ocen National Institutes of Health (NIH) (łagodne, umiarkowane i ciężkie). Fotoferezę wykonywano metodą offline.

Mediana wieku pacjentów wynosiła 54 lata (zakres 20–69). U 2 pacjentów stwierdzono objawy łagodne, u 7 umiarkowane, a u 2 — ciężkie. U wszystkich pacjentów występowało zajęcie skóry i błon śluzowych (u 4 również oczu).

U 6 pacjentów (55%) ECP zastosowano jako terapię drugiego rzutu, u 4 (36%) — trzeciego, a u 1 (9%) — szóstego. U 9 pacjentów (82%) obserwowano odpowiedź kliniczną, podczas gdy u 2 (18%) nie stwierdzono żadnego efektu.

W opinii autorów stosowanie ECP jako dodatku do terapii konwencjonalnej zapewniło znaczące efekty terapeutyczne, a w przypadku większości pacjentów było bezpieczne i dobrze tolerowane. Po zabiegu nie stwierdzono większych zmian stężenia hemoglobiny i liczby płytek krwi. W podsumowaniu stwierdzono, że w celu kontynuacji badań wskazane jest określenie zasad przeprowadzania standaryzowanej oceny odpowiedzi klinicznej oraz wykonanie prospektywnych kontrolowanych badań klinicznych.

Praca pochodząca z Izraela (Dann i wsp., Blood Bank and Apheresis Unit, Rambam Health Care Campus, Kfar Yehoshua) zawierała ocenę efektywności pobierania komórek z krwi obwodowej w celu wykonania ECP w trybie offline przy zastosowaniu separacji metodą ciągłą lub przerywaną [10]. W pobranych preparatach oceniano liczbę neutrofilii, limfocytów i monocytów, a także hematokryt i liczbę płytek krwi.

Jak stwierdzono, mediana liczby płytek krwi w koncentracji uzyskanym metodą przerywaną była o 25% wyższa niż w przypadku metody ciągłej (odpowiednio 1349/ μ l vs. 1076/ μ l). Także zawartość limfocytów i monocytów była większa w przypadku metody przerywanej (odpowiednio 59% vs. 49% i 36% vs. 32%). Mediana całkowitej liczby komórek jednojądrzastych w preparacie wynosiła odpowiednio 6×10^9 w przypadku metody przerywanej i 5×10^9 przy zastosowaniu metody ciągłej. Natomiast mediana odsetka neutrofilii była niższa w przypadkach metody przerywanej (odpowiednio 5,1% vs. 18,2%).

W podsumowaniu autorzy stwierdzają, że obydwie stosowane metody zapewniały podobną

jakość pobranego preparatu, jeżeli chodzi o liczbę WBC i wartość hematokrytu. Wprawdzie wyższy odsetek komórek jednojądrzastych i niższy neutrofilii uzyskano, stosując procedurę przerywaną, jednak osiągnięto to kosztem o 25% większej liczby płytek krwi w preparacie.

Podsumowanie

Hemaferesa lecznicza, w tym różne techniki cytaferazy, to interesujące i podlegające ciągłym modyfikacjom metody lecznicze stosowane obecnie w terapii wielu chorób. Przydatność hemaferazy leczniczej w wielu stanach klinicznych nie została jednak dostatecznie udokumentowana, a kontrolowane badania są wciąż nieliczne.

Najwięcej prezentowanych w ramach omawianego kongresu doniesień pochodziło z Hiszpanii, co jednak przypuszczalnie można, przynajmniej częściowo, wiązać z faktem, że tam właśnie — w Barcelonie — miały się pierwotnie odbywać obrady. Zmiana charakteru kongresu na wirtualny nastąpiła już po zgłoszeniu prac, w związku z wybuchem pandemii COVID-19.

Uwagę zwraca spora liczba prac poświęconych cieszącej się ostatnio znacznym zainteresowaniem metodzie fotoferezy (5 doniesień, czyli drugie miejsce po 14 doniesieniach omawiających zastosowania plazmaferazy leczniczej). Całkowicie zabrakło natomiast analiz poświęconych zastosowaniom leczniczej trombaferazy (poza podsumowaniem 20-letnich doświadczeń w pracy pochodzącej z Polski) [2].

Należy przy tym zwrócić uwagę na to, że doniesienia prezentowane w czasie naukowych kongresów nie zawsze odzwierciedlają aktualne trendy i skalę zastosowania hemaferazy leczniczej. W niektórych stanach klinicznych hemaferesa lecznicza może obecnie tracić na znaczeniu w związku z wprowadzaniem alternatywnych metod leczenia, co znajduje odzwierciedlenie między innymi w najszerszej obecnie stosowanych i cytowanych przez wielu autorów wytycznych ASFA (aktualizowanych ostatnio w czerwcu 2019 roku) [3]. Zgodnie jednak z obserwacjami autorów omówionych powyżej prac przynajmniej w niektórych przypadkach hemaferesa lecznicza, w tym cytaferesa, nadal pozostaje przydatna jako uzupełniająca i pomocnicza metoda leczenia.

Piśmiennictwo

1. Rosiek A. Hemaferesa lecznicza w świetle danych przedstawionych w czasie 36. Międzynarodowego Kongresu ISBT (kongres wirtualny, 12–16 grudnia 2020 r.). Część I — plazmaferesa

- za lecznicza. *J Transf Med.* 2021; 14(1): 32–40, doi: [10.5603/jtm.2021.0003](https://doi.org/10.5603/jtm.2021.0003).
2. Rosiek A, Lachert E, Antoniewicz-Papis J, et al. Two decades of therapeutic apheresis at the Warsaw Institute of Hematology and Transfusion Medicine. *Vox Sanguinis.* 2020; 115(suppl. s1): 310.
 3. Padmanabhan A, Connelly-Smith L, Aqui N, et al. Guidelines on the use of therapeutic apheresis in clinical practice - evidence-based approach from the Writing Committee of The American Society for Apheresis: the eighth special issue. *J Clin Apher.* 2019; 34(3): 171–354, doi: [10.1002/jca.21705](https://doi.org/10.1002/jca.21705), indexed in Pubmed: [31180581](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31180581/).
 4. Martines Lázaro B, Collado P, Auria C, et al. Erythroapheresis as secondary acute cerebrovascular accident prophylaxis in a patient with sickle cell disease. *Vox Sanguinis.* 2020; 115(suppl. s1): 310.
 5. Lee H, Yoo J, Kim M, et al. Cyto-reduction by leukapheresis was associated with unfavorable prognosis. *Vox Sanguinis.* 2020; 115(suppl. s1): 311.
 6. Navarro L, Moreno D, Bartual M, et al. Extracorporeal photopheresis (ECP) in pediatric patients: a single-centre experience. *Vox Sanguinis.* 2020; 115(Suppl. s1): 57.
 7. Paciello Coronel M, Leivas Aldea A, Redondo Velao S, et al. One Center experience in offline technique validation with biological quality tests. *Vox Sanguinis.* 2020; 115(Suppl. s1): 366.
 8. Fernandez Rodriguez A, Garcia Gala J, Martinez Revuelta E, et al. Use of extracorporeal photopheresis: our experience in Sezary syndrome and erythrodermic mycosis fungoides. *Vox Sanguinis.* 2020; 115(Suppl. s1): 374.
 9. Medina Guerrero E, Diaz Carbonero J, Perez Montana A. Results of extracorporeal photochemotherapy as treatment of chronic graft-versus-host disease in our center. *Vox Sanguinis.* 2020; 115(suppl. s1): 375.
 10. Dann EJ, Eisa J, Badian A, et al. Comparison of extracorporeal photopheresis performed using Offline Spectra Optia® with continuous or intermittent mononuclear cell collection programs for the treatment of graft-versus-host disease. *Vox Sanguinis.* 2020; 115(suppl. s1): 369.



**Od ponad 25 lat aktywnie uczestniczymy
w rozwoju nauki i edukacji medycznej**



wydajemy ponad 1200
publikacji oraz broszur



wydajemy
ponad 40 czasopism



organizujemy ponad
180 konferencji rocznie



udostępniamy ponad
8000 godzin filmów edukacyjnych



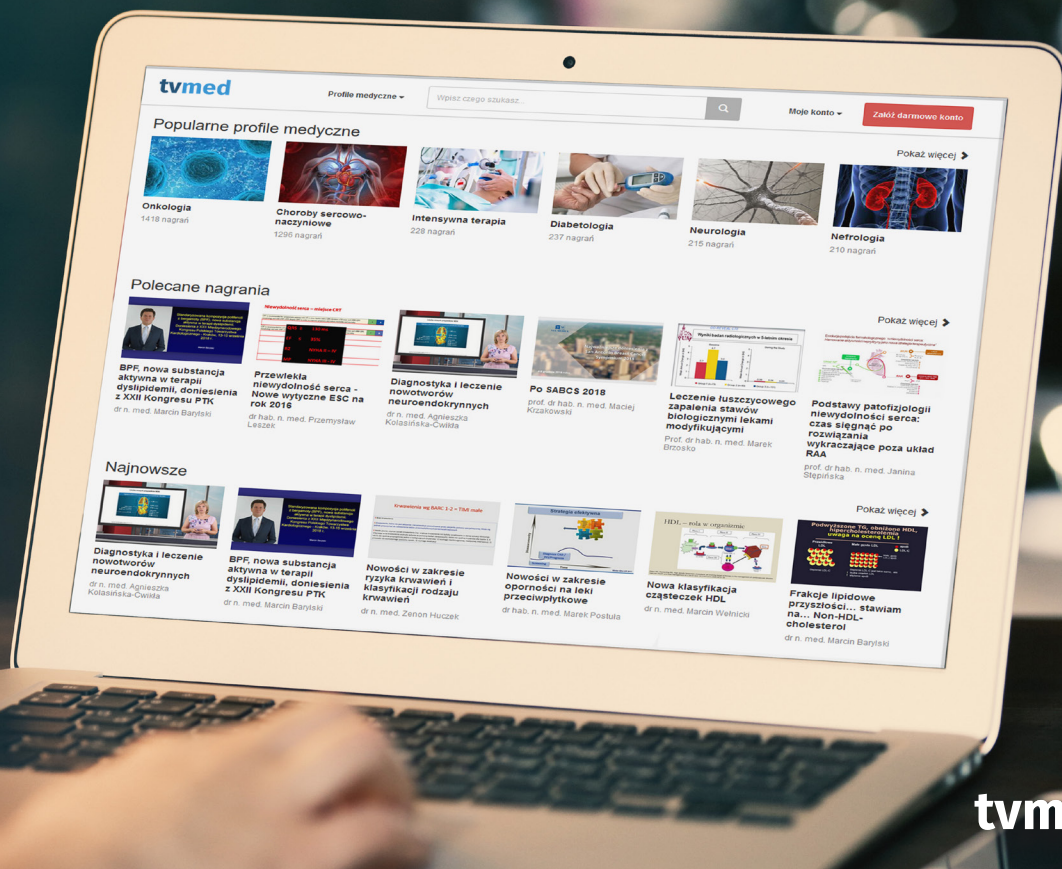
prowadzimy ponad
40 serwisów internetowych

**Zapraszamy do zapoznania się z różnorodną ofertą produktów
proponowanych przez Via Medica już teraz!**

www.viamedica.pl

Znajdź nas na





tvmed | OGLĄDAJ
TERAZ

MULTIMEDIALNA PLATFORMA WIEDZY MEDYCZNEJ

tvmed

- Ponad 5000 wyemitowanych nagrań
- Ponad 300 transmitowanych konferencji
- Ponad 2000 współpracujących z nami specjalistów
- Ponad 1600 godzin materiałów wideo

Dostęp do najlepszej wiedzy medycznej
w ramach jednej prostej opłaty.
Warto skorzystać już dziś!

www.tvmed.pl