

# Važnost trajne odgode dobrovoljnih davatelja krvi na temelju pozitivnih protutijela na sržni antigen hepatitis B virusa prije uvođenja testa amplifikacije nukleinskih kiselina

---

Slavulj, Blaženka

Master's thesis / Diplomski rad

2018

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:434081>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska**  
**dijagnostika**

**Blaženka Slavulj**

**VAŽNOST TRAJNE ODGODE**  
**DOBROVOLJNIH DAVATELJA KRVI NA**  
**TEMELJU POZITIVNIH PROTUTIJELA**  
**NA SRŽNI ANTIGEN HEPATITIS B**  
**VIRUSA PRIJE UVOĐENJA TESTA**  
**AMPLIFIKACIJE NUKLEINSKIH**  
**KISELINA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2018.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska**  
**dijagnostika**

**Blaženka Slavulj**

**VAŽNOST TRAJNE ODGODE**  
**DOBROVOLJNIH DAVATELJA KRVI NA**  
**TEMELJU POZITIVNIH PROTUTIJELA**  
**NA SRŽNI ANTIGEN HEPATITIS B**  
**VIRUSA PRIJE UVOĐENJA TESTA**  
**AMPLIFIKACIJE NUKLEINSKIH**  
**KISELINA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2018.**

Rad je ostvaren u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek, Odjelu serološke i imunohematološke dijagnostike davatelja krvi u suradnji s Hrvatskim zavodom za transfuzijsku medicinu, Petrova 3, Zagreb, Odjel za molekularnu dijagnostiku, NAT laboratorijem.

Mentor rada: prof. prim. dr. sc. Marina Samardžija, dr. med., specijalistica transfuziologije

Rad ima 48 listova i 7 tablica.

## **ZAHVALA**

*Iskrena zahvala mentorici prof. prim. dr. sc. Marini Samardžija, dr. med. na podršci, nesebičnoj ljudskoj i stručnoj pomoći. Hvala na povjerenju, strpljivosti i razumijevanju tijekom dugogodišnje suradnje.*

*Veliko hvala mojoj obitelji, sinu Marku i supruhu, na strpljenju, odricanju i pomoći tijekom studiranja.*

## POPIS KRATICA KORIŠTENIH U RADU

„anti-HBc only“, engl. - osobe s pozitivnim samo anti-HBc-testom

Ag-Pt - spoj antigen-protutijelo

anti-HBc - protutijelo na jezgreni (engl. *core*) antigen hepatitisa B

anti-HBc IgM - protutijelo na jezgreni (engl. *core*) antigen hepatitisa B IgM klase

anti-HBc IgG - protutijelo na jezgreni (engl. *core*) antigen hepatitisa B IgG klase

anti-HBe - protutijelo na antigen ovojnice (engl. *envelope*) virusa hepatitisa B

anti-HBs protutijelo na površinski (engl. *surface*) antigen virusa hepatitisa B

cccDNK – engl. *covalently closed circular deoxyribonucleic acid*, kovelentno zbijena prstenasta deoksiribonukleinska kiselina

DDK - dobrovoljni davatelj krvi

EIA – engl. *enzyme immunoassay*, enzimski imunotest

HBcAg – engl. *hepatitis B core antigen*, jezgreni antigen virusa hepatitisa B

HBeAg – engl. *hepatitis B envelope antigen*, antigen ovojnice virusa hepatitisa B

HBsAg – engl. *hepatitis B surface antigen*, površinski antigen virusa hepatitisa B

HBV - virus hepatitisa B

HBV DNK - deoksiribonukleinska kiselina virusa hepatitisa B

HCC – engl. *hepatocellular carcinoma*, hepatocelularni karcinom

HCV RNK - ribonukleinska kiselina virusa hepatitisa C

HCV - virus hepatitisa C

HDV - virus hepatitisa D

HIV - engl. *human immunodeficiency virus*, virus humane imunodeficijencije

HIV1 RNK - ribonukleinska kiselina virusa humane imunodeficijencije 1

ID-NAT - engl. *individual donor-nucleic acid testing*, pojedinačni test amplifikacije nukleinskih kiselina davatelja krvi

KZTM KBCO - Klinički zavod za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek

mRNK – engl. *messenger ribonucleic acid*, glasnička ribonukleinska kiselina

OBI - okultna hepatitis B virusna infekcija

OBŽ - Osječko-baranjska županija

PCR – engl. *polymerase chain reaction*, lančana reakcije polimeraze

RH - Republika Hrvatska

RT – engl. *reverse transcriptase*, reverzna transkriptaza

SAD - Sjedinjene Američke Države

SID - Odjel za serološku i imunohematološku dijagnostiku dobrovoljnih davatelja krvi

SZO - Svjetska zdravstvena organizacija

## POPIS TABLICA

Tablica 1. Interpretacija seroloških rezultata HBV-markera

Tablica 2. Interpretacija rezultata testiranja na anti-HBc kompetitivnim testom i algoritam testiranja

Tablica 3. Prikaz broja trajno odgođenih DDK u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu KBC Osijek i Republici Hrvatskoj

Tablica 4. Prikaz serološkog statusa trajno odgođenih dobrovoljnih davatelja krvi u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu KBC Osijek

Tablica 5. Prikaz raspodjele trajno odgođenih dobrovoljnih davatelja krvi prema broju davanja krvi u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu KBC Osijek i Republici Hrvatskoj

Tablica 6. Prikaz raspodjele trajno odgođenih dobrovoljnih davatelja krvi prema spolu u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu KBC Osijek i Republici Hrvatskoj

Tablica 7. Prikaz broja dobrovoljnih davatelja krvi s okultnom hepatitis B virusnom infekcijom u Republici Hrvatskoj i Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu KBC Osijek



## SADRŽAJ

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. UVOD .....                                                                     | 1  |
| 1.1. VIRUS HEPATITISA B .....                                                     | 2  |
| 1.1.1. EPIDEMIOLOGIJA VIRUSA HEPATITISA B .....                                   | 3  |
| 1.1.2. PUT PRIJENOSA VIRUSA HEPATITISA B .....                                    | 4  |
| 1.1.3. PATOGENEZA VIRUSA HEPATITISA B .....                                       | 4  |
| 1.2. POVRŠINSKI ANTIGEN VIRUSA HEPATITISA B - HBsAg .....                         | 5  |
| 1.3. PROTUTIJELO NA JEZGRENI ANTIGEN VIRUSA HEPATITISA B – ANTI-HBc .....         | 5  |
| 1.4. OSTALI MARKERI HEPATITISA B I NJIHOVA INTERPRETACIJA .....                   | 8  |
| 1.4.1. PROTUTIJELO NA POVRŠINSKI S ANTIGEN VIRUSA HEPATITISA B - ANTI – HBs ..... | 10 |
| 1.4.2. E-ANTIGEN OVOJNICE VIRUSA HEPATITISA B - HBeAg .....                       | 10 |
| 1.5. OKULTNI HEPATITIS B .....                                                    | 11 |
| 1.6. DIJAGNOSTIKA DOBROVOLJNIH DAVATELJA KRV I NA VIRUS HEPATITISA B .....        | 12 |
| 1.7. PREVENCIJA I LIJEČENJE HEPATITISA B .....                                    | 13 |
| 2. CILJEVI RADA .....                                                             | 14 |
| 3. ISPITANICI I METODE .....                                                      | 15 |
| 3.1. DOBROVOLJNI DAVATELJ KRV I .....                                             | 15 |
| 3.2. METODE .....                                                                 | 16 |
| 3.3. PROBIRNO SEROLOŠKO TESTIRANJE NA VIRUS HEPATITISA B .....                    | 16 |
| 3.3.1. PROBIRNO HBsAg SEROLOŠKO TESTIRANJE .....                                  | 16 |
| 3.3.2. PROBIRNO SEROLOŠKO ANTI-HBc TESTIRANJE .....                               | 18 |
| 3.4. STATISTIČKE METODE .....                                                     | 19 |

|                     |    |
|---------------------|----|
| 4. REZULTATI.....   | 20 |
| 5. RASPRAVA.....    | 25 |
| 6. ZAKLJUČCI.....   | 29 |
| 7. SAŽETAK.....     | 30 |
| 8. SUMMARY .....    | 32 |
| 9. LITERATURA.....  | 34 |
| 10. ŽIVOTOPIS ..... | 38 |

## 1. UVOD

Hepatitis B veliki je javnozdravstveni problem. Rasprostranjenost hepatitis B virusa (HBV) u svijetu vrlo je velika. Procijenjeno je da 257 milijuna ljudi ima pozitivan površinski antigen virusa hepatitisa B (HBsAg) i da živi s HBV-infekcijom (1). Liječenje i skrb o bolesnicima koji boluju od hepatitisa B iziskuju veliki napor zdravstvenih djelatnika i ogromni ekonomski napor. Najveća koncentracija osoba koje imaju hepatitis B nalazi se u zemljama niskog ekonomskog statusa i većina tih osoba nema kvalitetnu zdravstvenu skrb. Iz svih navedenih razloga, Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) stavila je veliki naglasak na smanjenje rasprostranjenosti odnosno na sprječavanje prijenosa HBV-a u svijetu. Uz ostale putove prijenosa, jedan od mogućih putova prijenosa je i prijenos transfuzijom krvi i krvnih pripravaka. Cilj transfuzijskog liječenja i transfuzije krvi je pomoć čovjeku u potrebi, a da mu se ne nanese bilo kakva šteta. Svaka se donacija testira na uzročnike zaraznih bolesti prenosivih krvlju, virus hepatitisa B (HBV), virus hepatitisa C (HCV), virus humane imunodeficiencije (HIV) te na *Treponemu Pallidum*, uzročnika sifilisa. Rutinsko serološko enzimsko testiranje uzoraka krvi dobrovoljnih davatelja krvi (DDK) na HBsAg (površinski S antigen HBV-a) služi za izdvajanje i eliminaciju svih HBsAg-pozitivnih donacija krvi. Međutim, rezultat probirnog serološkog testiranja na HBsAg može biti lažno negativan, ukoliko se dobrovoljni davatelj krvi (DDK) nalazi u „dijagnostičkom prozoru“ (engl. *window period*), u slučaju da ima mutirani oblik HBsAg-a ili okultnu hepatitis B virusnu infekciju (OBI). Prema tome, postoji mogućnost prijenosa HBV-infekcije i uz negativan rezultat serološkog HBsAg-testa. Kod takvih se DDK-a može ponekad i dokazati prisutnost HBV deoksiribonukleinske kiseline (HBV DNK) u serumu. Iz tog je razloga 2013. godine uveden pojedinačni test amplifikacije nukleinskih kiselina (engl. *Individual donor nucleic acid amplification test*; ID-NAT) u cilju dokazivanja HBV DNK, HCV ribonukleinske kiseline (HCV RNK) i HIV1 ribonukleinske kiseline (HIV1 RNK) u serumu DDK. U razdoblju nakon otkrića okultne hepatitis B virusne infekcije (OBI) i mutiranih oblika HBV-a do vremena uvođenja ID-NAT-a, nije bilo moguće testirati sve uzorke krvi lančanom reakcijom polimeraze – engl. *polymerase chain reaction* (PCR) metodom iz ekonomskih razloga kao i zbog njegove osjetljive i komplicirane tehnologije. Jedini sigurni pokazatelj da je DDK bio u

kontakta s HBV-om je pozitivan rezultat serološkog anti-HBc-testa. Iz tog razloga 2006. godine Klinički zavod za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek (KZTM KBCO), Odjel za serološku i imunohematološku dijagnostiku dobrovoljnih davatelja krvi (SID), na inicijativu predstojnice Klinike prof. prim. dr. sc. Marine Samardžija u cilju osiguranja što kvalitetnijih i sigurnijih donacija krvi i njihovih pripravaka, u rutinsko testiranje HBV-a uz testiranje na HBsAg uvodi i dodatni, enzimski anti-HBc-test. Iako testiranje nije bilo zakonski obvezno, predstojnica je bila mišljenja kako je itekako stručno opravdano jer je rezultat testa bio vrlo važan, a testiranje u granicama naših ekonomskih mogućnosti. Glavni cilj tog testiranja bio je probir davatelja koji su bili u kontaktu s HBV-om, bez obzira na negativan rezultat probirnog serološkog HBsAg-testa. DDK s pozitivnim anti-HBc-testom mogli su imati lažno pozitivan anti-HBc-test ili su mogli pripadati kategorijama DDK s OBI-om, infekcijom mutiranim HBV-om ili su mogli preboljeli hepatitis B uz prisutnost specifičnih protutijela u krvi. Iako na temelju rezultata HBsAg i anti-HBc-testa nije bilo moguće dokazati o kojoj se kategoriji DDK radi, značajno je da su ti DDK bili u kontaktu s HBV-om te da su neki od njih mogući prenositelji HBV-a. Na svjetskoj razini dokazan je prijenos HBV-a s davatelja na primatelja putem transfuzije za vrijeme „dijagnostičkog prozora“, kod DDK koji imaju pozitivan samo anti-HBc (engl. *anti-HBc only*) pa čak i kod DDK koji nemaju pozitivan niti jedan HBV-marker ili HBV DNK. Izdvajanjem HBsAg i anti-HBc-pozitivnih donacija krvi direktno je spriječen kontakt s njima. Onemogućeno je daljnje prikupljanje, proizvodnja, prerada i primjena takvih donacija krvi i krvnih pripravaka. Na taj je način spriječen mogući prijenos HBV-a.

Ovaj će rad na temelju dobivenih rezultata dati informaciju u kojem je opsegu testiranje na anti-HBc u 2006. godini pridonijelo daljnjem sprječavanju prijenosa HBV-a.

## 1.1. VIRUS HEPATITISA B

Virus hepatitisa B pripada porodici Hepadna virusa. Inficira ljude i neke životinjske vrste; istočnoameričke svisce, vjeverice, patke i čaplje. Hepatotropni je virus, no nađen je i u mononuklearnim stanicama periferne krvi (PBMC) i stanicama gušterače (2).

Može se naći u dva oblika: HBV virion (*Daneovo tjelešce*) i subvirusna partikula. HBV virion je okrugla čestica promjera 42 nm s vanjskom lipoproteinskom ovojnicom, unutar koje se nalazi

virusna nukleokapsida ili jezgra (engl. *core*). Na površini virusne čestice nalazi se površinski S antigen (HBsAg). Jezgra se sastoji od virusne DNK, hepatitisa B jezgrenog antigena (HBcAg), DNK polimeraze/reverzne transkriptaze, protein kinaze i hepatitis B ranog antigena ovojnice – engl. *envelope* Ag (HBeAg). Subvirusne su partikle okrugle strukture veličine 22 nm i filamentozne strukture različite veličine (HBsAg) koje nisu prijenosne jer ne sadržavaju DNK, no izrazito su imunogene te stimuliraju produkciju niza neutralizirajućih protutijela. Postoje brojni genotipovi HBV-a (A - H) za koje je karakteristična geografska distribucija. Područjem zapadne Europe dominira genotip A, dok je za područje Mediterana najznačajniji genotip D.

Genom virusa kodira preko četiriju preklapajućih otvorenih okvira za čitanje (P, S, C, X) te odgovarajućih mRNK četiriju glavnih proteina: polimeraze (P), površinski antigen – engl. *surface* (pre-S/S), proteinski omotač nukleokapside – engl. *core* (pre-C/C) i X protein čija je aktivnost potrebna za *in-vivo* replikaciju i širenje virusa (3, 4). HBV ima deset puta veću razinu mutacija genoma od drugih DNK virusa što je vrlo važno u njegovoj detekciji. Vrlo je otporan na vanjske utjecaje, na temperaturi 30 – 32 °C zarazan je i nakon 6 mjeseci, a na sobnoj temperaturi u sasušenoj krvi do tjedan dana. Mutacije mogu nastati spontano ili pod utjecajem cjepiva, antivirusnih lijekova, monoklonskih protutijela, hepatitis B imunoglobulina (HBIG). Mutacije se nalaze kod akutnog hepatitisa, fulminantnog hepatitisa, kroničnog hepatitisa kao i kod reinfekcija nakon transplantacije jetre i kod imunokompromitiranih osoba. Najčešća mutacija na lijekove je mutacija nakon dugotrajnog uzimanja analoga nukleozida (lamivudin) (2). Grubom podjelom hepatitis B dijelimo na akutni, kronični i okultnu hepatitis B virusnu infekciju (OBI).

### 1.1.1. EPIDEMIOLOGIJA VIRUSA HEPATITISA B

Približno trećina svjetske populacije za vrijeme života dođe u kontakt s HBV-om. Od hepatitisa B, u svijetu je umrlo 887 000 ljudi 2015. godine, najčešće zbog komplikacija, uključujući cirozu i hepatocelularni karcinom (HCC). Najveća prevalencija hepatitisa B je u Zapadnom pacifičkom području Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) (6,2 %) i u Afričkom području SZO-a (6,1 %). U Istočnom mediteranskom području SZO-a (3,3 %), Južnoistočnom azijskom području SZO-a (2,0 %) i Europskoj regiji SZO-a (1,6 %) populacije je inficirano HBV-om. U regiji Amerika SZO-a (Sjeverna i Južna Amerika) inficirano je 0,7 % populacije (1). U Republici Hrvatskoj (RH) kroničnih nositelja ima oko 65 000, a većinu čine muškarci. U

perzistentnu infekciju prelazi 10 - 30 % svih HBV-infekcija u svijetu. Od toga su 60 % osoba bolesnici s kroničnim hepatitisom, a 40 % zdravi nositelji HBsAg-a. Od osoba s kroničnim hepatitisom, 50 % može dobiti cirozu, a 10 % HCC (5). Virus je nađen u tjelesnim tekućinama (krvi, spermi, slini, fecesu, urinu, žuči, likvoru, znoju, majčinu mlijeku, suzama, vaginalnom sekretu, sinovijalnoj tekućini i u krvi pupčane vrpce (2).

### 1.1.2. PUT PRIJENOSA VIRUSA HEPATITISA B

Najčešći put prijenosa je parenteralni ili inaparentni parenteralni (krv i krvni pripravci, spolni kontakt, tetovaža, ovisnost o intravenskim drogama, bušenje ušiju, zajedničko korištenje pribora za osobnu higijenu...), a iznimno neparenteralni (azili za mentalno retardirane osobe, uski kućni kontakti).

Prijenos s majke na dijete može se dogoditi intrauterino, prolaskom kroz porođajni put, nakon rođenja dojenjem ili horizontalno u uskom kontaktu između majke i djeteta.

U svijetu se kontaminiranim iglama prenese 8 - 16 milijuna HBV-infekcija na godinu. Nakon uboda na iglu onečišćenu HBsAg-om rizik prijenosa je 23 – 67 % ovisno o izvoru infekcije kao i o HBeAg statusu (2).

### 1.1.3. PATOGENEZA VIRUSA HEPATITISA B

Ulaskom virusa u organizam nastaje viremija. Virus dolazi u jetru gdje penetracijom preko stanične membrane ulazi u citoplazmu stanice. U jezgri nastaje kovalentno zbijena prstenasta DNK (engl. „ccc-DNA - covalently closed circle DNA“) koja služi kao mini-kromosom prema kojem se sintetizira kompletna molekula RNK, koju polimeraza zapakira u virusnu česticu unutar koje reverzna transkriptaza (RT) sintetizira novi DNK genom. Iz tog razloga ccc-DNK u jezgri hepatocita može u svakom trenutku potaknuti replikaciju virusa. Gotov virus pupanjem izlazi na površinu hepatocita i može inficirati drugu stanicu.

Moguća su dva oblika infekcije: replikativni, s gotovim kompletnim virusnim česticama i nereplikativni gdje dolazi do stvaranja samo HBsAg-a (inaktivni nositelji).

Patogenezu čine četiri faze: tolerancija prema virusu (kod akutne infekcije inkubacija), imunosna faza (nekroza hepatocita posredovana imunosnim odgovorom), faza eliminacije (smanjenje

replikacije virusa i njegova eliminacija) i serokonverzija HBsAg-a (stvaranje specifičnog odgovora u obliku protutijela) (2).

## 1.2. POVRŠINSKI ANTIGEN VIRUSA HEPATITISA B - HBsAg

HBsAg je prvi serološki biljeg koji se javlja kod HBV-infekcije (6). Inkubacija nakon infekcije traje između 6 i 8 tjedana. Tek se tada javljaju klinički simptomi. Kroz akutnu fazu bolesti HBsAg ima visok titar nekoliko tjedana, a zatim kontinuirano pada. U prosjeku to razdoblje traje do 6 mjeseci (od nekoliko tjedana do 3 mjeseca), ako se radi o HBV-infekciji nekomplikiranog tijeka. Kod nekih bolesnika HBsAg egzistira svega nekoliko dana te je kod 10 % bolesnika tijekom imunih zbivanja ubrzan i oni dolaze bez HBsAg-a. To je takozvana HBsAg-negativna akutna HBV-infekcija i tu je važno odrediti anti-HBc IgM klase (3). Mogućnost prijenosa HBV-a uz negativan rezultat HBsAg-testa kao kod negativne akutne HBV-infekcije moguć je i kod infekcije mutiranim HBsAg-om. Mutirani HBsAg nastaje pod utjecajem raznih čimbenika, najčešće lijekova (npr. lamivudin). Mnogobrojne mutacije virusa hepatitisa B i imunosupresivne mutacije prisutni su u HBV-površinskom antigenu, HBsAg-u i reverznoj transkriptazi pacijenata s akutnim hepatitisom B (7). Isto tako, prijenos HBV-a moguć je i ukoliko se radi o okultnoj HBV-infekciji (OBI). Kod kroničnog je hepatitisa HBsAg stalno pozitivan (3).

Probirno testiranje površinskog antigena virusa hepatitisa B (HBsAg) smanjuje rizik prijenosa HBV-infekcije transfuzijom krvi (8). Testiranje samo na HBsAg ne daje potpunu zaštitu pa se anti-HBc preporuča kao probirni test (9).

## 1.3. PROTUTIJELO NA JEZGRENI ANTIGEN VIRUSA HEPATITISA B – ANTI-HBc

Anti-HBc protutijelo kao i ostala HBV-protutijela pripadaju imunoglobulinima, specifičnim globulinima koji se kod sisavaca javljaju kao reakcija organizma na određeni antigen. Anti-HBc je protutijelo na HBcAg, sržni antigen virusa hepatitisa B (engl. hepatitis B „core“ antigen), vezan je uz jezgru HBV-a. Ne cirkulira krvlju i iz tog razloga ga nije moguće dokazati u njoj. Vrlo je jak imunogen što rezultira visokim titrom anti-HBc protutijela. Inkapsulira hepatitis delta genom (10).

Anti-HBc se uz anti-HBs i anti-HBe protutijela javlja u različitim fazama HBV-infekcije, akutne, kronične, OBI-a kao i kod infekcije mutiranim HBsAg-om. Sastavni je dio markera hepatitisa B, može biti IgM i IgG klase. Testiranje na ukupni anti-HBc uključuje dokazivanje ukupnih protutijela IgM i IgG klase kako bi se obuhvatile sve faze i oblici hepatitisa B. Anti-HBc IgM protutijelo pojavljuje se vrlo rano nakon infekcije. Nije dugovječno pa obično nestaje između 6 i 24 mjeseci. Njegova prisutnost u krvi najčešće ukazuje na akutnu HBV-infekciju. Anti-HBc IgG može se naći rano, prije pojave simptoma bolesti i može opstati duže od 10 godina nakon izlječenja. Prisutno je i kod osoba koje su preboljele HBV-infekciju i tada ga je moguće dokazati u serumu uz ostala navedena protutijela. Najdugovječnije je protutijelo od svih protutijela koja se javljaju nakon kontakta s HBV-om. Najvažniji je biljeg prethodne infekcije. Važno je napomenuti da je samo on pozitivan u fazi kada je HBsAg postao negativan, a anti-HBs se još nije pojavio. Dobar je prediktor i sigurni pokazatelj kontakta s HBV-om. HBsAg može opstati vrlo kratko pa je kod 10 % oboljelih već eliminiran pri prvom dolasku na pregled. Za pojavu anti-HBc-a potrebno je duže vrijeme, ponekad i nekoliko mjeseci. U serumu se najčešće nalazi vrlo visok titar anti-HBc-a, jer je HBcAg vrlo jak imunogen. Prisutan je kroz čitavo razdoblje bolesti i ozdravljenja (11). Perzistencija anti-HBc-a u odnosu na ostala protutijela na HBV je najduža i često je prisutan i nakon eliminacije anti-HBs-a. DDK koji imaju pozitivan samo anti-HBc od svih markera HBV-a (engl. „anti-HBc only“) mogu imati lažno pozitivan rezultat anti-HBc-a (nespecifična reakcija), riješenu HBV-infekciju, kroničnu infekciju s niskom ili nedetektabilnom količinom HBsAg-a (OBI) ili infekciju mutiranim oblicima HBV-a (12, 13). Anti-HBc važan je jer može ukazivati na prisutnost HBsAg-a (odnosno HBV-a) u količini koja je ispod granice detekcije. Tom se činjenicom mogu objasniti neki slučajevi posttransfuzijskog hepatitisa B (3). Prema studiji, „anti-HBc only“ su česti (155/379, 40,9 %), ali tek mali broj uzoraka ima detektabilnu HBV DNK (4 %). Prisutnost HBsAg mutanata s negativnim rezultatom HBsAg-testa izaziva vrlo veliku zabrinutost. Anti-HBc-test može se koristiti za praćenje pojave mutanata jer je pozitivan bez obzira na mutacije virusa (14). Određeni broj mutacija HBsAg-a direktno utječe na njegovo otkrivanje „in vitro“, prepoznavanje imunosti „in vivo“, infektivnost HBV-a, staničnog tropizma i morfologiju viriona (15). Prijenos HBV-a putem transfuzije kod DDK koji imaju OBI-a odnosno koji su „only anti-HBc“ iznosi oko 3 %, dok je prijenos HBV-a za vrijeme „dijagnostičkog prozora“ moguć u 50 % slučajeva (10). Prema jednoj studiji od 16 zabilježenih posttransfuzijskih hepatitisa, 10 je bilo pozitivno na anti-HBc, 3 na HBsAg, 3 na



anti-HBs (uz anti-HBc). Ti podatci su kompatibilni s hipotezom da anti-HBc test može biti osjetljiv pokazatelj stalne replikacije virusa i kada cirkuliraju subdetektabilne količine HBsAg-a (17). Iako je u početku anti-HBc-test uveden kako bi spriječio prijenos non-A i non-B hepatitisa, uvođenjem testa na hepatitis C on ipak ostaje u pojedinim zemljama u uporabi kako bi spriječio mogući prijenos hepatitisa B kod DDK koji imaju negativan HBsAg (18). Prevalencija HBV DNK-pozitivnih u populaciji anti-HBc-pozitivnih DDK iznosi od 0 do 15 % (19).

Prevalencija anti-HBc-pozitivnih DDK u Danskoj, u potvrdi iznosi 0,70 % uz naglasak da su prema analizama godine, ženski spol, tetovaže i komercijalni seksualni odnosi nezavisni predskazujući faktori prisutnosti anti-HBc-a (20). Prema objavljenim studijama prevalencija anti-HBc-pozitivnih, HBsAg-negativnih i HBV DNK-negativnih DDK u Pakistanu iznosi 17,28 % (167/966). Jedan od 200 DDK koji su anti-HBc-pozitivni, HBsAg-negativni i HBV DNK-negativni ima OBI. Ukupno je u studiji pronađeno 5 slučajeva (21).

Studije u Japanu pokazuju prisutnost HBV DNK kod 19 od 50 HBsAg-negativnih, anti-HBc-pozitivnih DDK (38 %) (22). Prevalencija OBI DDK u Južnoj Koreji prema međunarodnom istraživanju 2008. godine procjenjuje se na 8,55 na milijun donacija (19). U Ujedinjenom Kraljevstvu prevalencija anti-HBc-pozitivnih DDK iznosi u probiru 1,29 %, a u potvrdi 0,35 %, dok kod “anti HBc only“ uz negativne ostale markere i negativan HBV DNK iznosi 0,04 % s naglaskom da nema dokaza da se značajno smanjuje incidencija posttransfuzijskog hepatitisa nakon testiranja na anti-HBc (23). U Nizozemskoj, od ukupno 382 173 DDK, probir je identificirao 13 potvrđenih ili potencijalnih HBsAg i HBV DNK negativne nedavne HBV-infekcije. Osim toga, 820 anti-HBc-pozitivna DDK s niskim titrom anti-HBs (< 200 IU/mL) identificiraju se i odgađaju zbog potencijalnog OBI-a (24). U Italiji prevalencija anti-HBc-pozitivnih iznosi 4,85 % (288 od 6 313 testiranih DDK). Kod 14 od njih dokazana je cirkulirajuća HBV DNK niskog titra (25). U Egiptu prevalencija anti-HBc-pozitivnih iznosi 7,8 % (80 od 1 026 testiranih). HBV DNK je detektirana u 6,25 % (u 5 od 80 anti-HBc-pozitivnih). Razine HBV DNK bile su različite kod svih 5 DDK (8). U Australiji je testirana 1 312 451 donacija krvi na HBsAg i HBV DNK. Na temelju rezultata testiranja izračunat je rezidualni rizik prijenosa HBV-a potencijalno infektivnih donacija negativnih u NAT-testu. 29 donacija (od 17 anti-HBc-pozitivnih DDK) kod kojih je ustanovljen OBI, bilo je u NAT-testu negativno. OBI rezidualni rizik iznosi 1 : 982 000 po transfundiranoj jedinici i čini 55 % ukupnog rezidualnog rizika (26). U istočnoj Aziji veliki je postotak osoba cijepljenih po rođenju protiv HBV-a, tako da im je sve veći

udio i u populaciji DDK-a. Cijepljeni DDK često su i blago inficirani, ali niska razina virusa i česti anti-HBs ograničavaju rizik prijenosa HBV-a transfuzijom (27).

Vrlo je važna činjenica da je moguć prijenos HBV-a i sa svim negativnim rezultatima HBV-a (17). Rutinski anti-HBc uveden je u SAD-u, Japanu i Njemačkoj. U Nizozemskoj je uveden u srpnju 2011. godine (24). U područjima niske prevalencije HBV-a poput Europe i SAD-a, 10 - 20 % osoba kojima su rađeni HBV-markeri tj. 1 - 4 % populacije ima pozitivan samo anti-HBc-test (engl. „anti-HBc only“). U 10 % tih osoba pronađen je HBV DNK (28).

Prema studijama, značajno je da niti jedan HBV NAT-test ne može zamijeniti testiranje na anti-HBc iz razloga što postoje „anti-HBc only“ s niskom razinom DNK koja se ne može uočiti samo jednim NAT-testiranjem. Takvi su slučajevi povezani s transfuzijskim transmisijom HBV-om. Testiranje na HBsAg je potrebno uz anti-HBc i NAT-testiranja jer neki HBsAg-pozitivni mogu imati vrlo nisku ili povremeno nedektabilnu razinu HBV DNK koje bi jedno NAT-testiranje moglo propustiti (29).

Probir na anti-HBc detektira HBsAg negativne DDK s HBV-om pri stopi koja je usporediva s procijenjenim rezidualnim rizikom za infekcije probira HBV-a. Niska razina HBV DNK u HBV DNK-pozitivnim uzorcima sugerira da „minipool - NAT“ neće otkriti većinu potencijalno infektivnih jedinica anti-HBc-pozitivnih DDK. U konačnici, osobe „anti-HBc only“ su potencijalno infektivne (30).

### 1.4. OSTALI MARKERI HEPATITISA B I NJIHOVA INTERPRETACIJA

Markeri hepatitisa B skup su antigena i protutijela čiji nam rezultati testiranja govore o kojoj se vrsti HBV-infekcije radi, odnosno u kojem je stadiju HBV-infekcija. Marker HBV-a sastoje se od rezultata testiranja na dva antigena: HBsAg i HBeAg te testiranja na protutijela: anti-HBs, anti-HBc ukupni (IgM i IgG klase), anti-HBc IgM i anti-HBe. HBcAg je jezgri antigen i nije ga moguće dokazati u cirkulaciji.

Sastav HBV-markera, ovisno o vremenu proteklom od infekcije, može se mijenjati, a te promjene su odraz s jedne strane replikacije B virusa, a s druge strane imunih odgovora bolesnika, u našem slučaju DDK.

Interpretacija rezultata markera HBV-a vrlo je važna u dijagnostici HBV-a i uz rezultat HBV DNK-testa velika je pomoć u dijagnostici OBI-a, mutiranog HBV-a ili „dijagnostičkog prozora“ HBV-a, a radi se prema Tablici 1 (31).

Tablica 1. Interpretacija seroloških rezultata HBV-markera

| INTERPRETACIJA REZULTATA HBV-MARKERA                                 |                                                                                                                                                                                   |
|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HBsAg (-)<br>ukupni anti-HBc (-)<br>anti-HBs (-)                     | bez prijašnjeg kontakta, osjetljiv                                                                                                                                                |
| HBsAg (-)<br>ukupni anti-HBc (+)<br>anti-HBs (+)                     | imun nakon preboljenog HBV-a                                                                                                                                                      |
| HBsAg (-)<br>ukupni anti-HBc (-)<br>anti-HBs (+)                     | imun nakon cijepljenja protiv hepatitisa B                                                                                                                                        |
| HBsAg (+)<br>ukupni anti-HBc (+)<br>anti-HBc IgM (+)<br>anti-HBs (-) | akutno inficiran                                                                                                                                                                  |
| HBsAg (+)<br>ukupni anti-HBc (+)<br>anti-HBc IgM (-)<br>anti-HBs (-) | kronično inficiran                                                                                                                                                                |
| HBsAg (-)<br>ukupni anti-HBc (+)<br>anti-HBs (-)                     | interpretacija nejasna - 4 mogućnosti:<br>1. riješena infekcija (najčešće)<br>2. lažno pozitivan anti-HBc<br>3. niska razina kronične infekcije<br>4. rješavanje akutne infekcije |

#### 1.4.1. PROTUTIJELO NA POVRŠINSKI S ANTIGEN VIRUSA HEPATITISA B - ANTI – HBs

Anti-HBs je protutijelo koje se javlja neposredno nakon nestanka HBsAg-a. Njegova se pojava u akutnoj infekciji smatra ozdravljenjem. U rijetkim se slučajevima u akutnoj i kroničnoj infekciji mogu dokazati i HBsAg i anti-HBs istovremeno. Kod cijepljenih osoba anti-HBs je znak cijepljenja i jedini je pozitivan od svih markera. Uobičajeno je titar anti-HBs-a nakon prirodne infekcije u pravilu viši nego u cijepljenih osoba (2). OBI je ponekad prisutan i kod HBsAg-negativnih, anti-HBc i anti-HBs-pozitivnih DDK (32). Razdoblje od nestanka HBsAg-a do pojave anti-HBs-a naziva se engl. „core window“ jer se u tom razdoblju od HBV-markera u krvi može dokazati samo anti-HBc protutijelo (engl. „anti-HBc only“) (11). Prisutnost anti-HBs-a nije uvijek pokazatelj odsutnosti virusa (9).

#### 1.4.2. E-ANTIGEN OVOJNICE VIRUSA HEPATITISA B - HBeAg

HBeAg se javlja usporedno s HBsAg-om ili ubrzo nakon njega. Svakako prije pojave kliničkih simptoma. Nestrukturni je protein koji je smješten uz nukleokapsidu HBV-čestice. On je pokazatelj replikacije HBV-a i jačine infektivnosti i samim tim je važan u prognozi ishoda bolesti. Prisutnost HBeAg-a je uvijek nepovoljan znak (3).

#### 1.4.3. PROTUTIJELO NA E ANTIGEN VIRUSA HEPATITISA B - ANTI-HBe

Anti-HBe je protutijelo slične dinamike kao i anti-HBs. Javlja se nakon eliminacije HBeAg-a, može se pojaviti i neko vrijeme prije eliminacije HBeAg-a, ali se može pojaviti i usporedno s njim. HBeAg i anti-HBe imaju veliku ulogu kako u dijagnostičkom tako i u prognostičkom smislu. Mutirani oblici HBV-a koji imaju mutaciju u pre-core regiji ne mogu sintetizirati i producirati HBeAg i imaju veću količinu HBV DNK-a u krvi, teži oblik kliničkog hepatitisa i češću pojavu fulminantne bolesti. Zato je uočavanje HBeAg-a i anti-HBe-a jako važan dio dijagnostike HBV-infekcije (3).

## 1.5. OKULTNI HEPATITIS B

Okultna hepatitis B virusna infekcija karakterizirana je prisutnošću HBV-infekcije s nedetektabilnim HBsAg-om. Kod takvih je bolesnika serumska razina HBV-a uobičajeno niža od  $10^4$  kopija/ml. Dijagnoza OBI-a zahtijeva testiranje HBV DNK PCR-testom.

Mogući mehanizmi nastanka OBI-a su sljedeći:

- a) Smetnje u replikaciji HBV-a od strane drugih virusa (HCV, HDV, Schistosoma mansoni)
- b) Integracija HBV DNK u kromosome stanica domaćina (onkogeneza)
- c) Stvaranje kružnog imunog kompleksa koji sadrži HBV, koji nisu otkriveni u rutinskom testiranju na HBsAg
- d) Promijenjen imunski odgovor domaćina koji vodi ka održavanju HBV-infekcije u latentnom stanju, dok je prijenos na drugu osobu moguć (najčešće u slučajevima imunosupresivne terapije)
- e) Različite mutacije u HBV DNK slijedu (mutacije u S, X i P regiji).

Podjela OBI-a:

1. a) Seropozitivan OBI (anti-HBc i/ili anti-HBs)
- b) Seronegativan OBI (anti-HBc i anti-HBs negativni)

Razina je HBV DNK niža od 200 IU/ml.

2. Lažni (engl. "false") OBI (infekcija mutiranim S genom)

Razina je HBV DNK usporediva s očitom HBV-infekcijom.

Moguća je prisutnost zaraznih virusnih klonova.

Nositelji OBI-a na više načina mogu prenijeti OBI. OBI se može reaktivirati kod imunosuprimiranih ili dovesti do težih oštećenja jetre ukoliko se udruži s nekom drugom bolesti jetre. Hoće li se javiti ili se neće javiti jasna HBV-infekcija s pozitivnim HBsAg-om i HBV DNK-testom ponajviše ovisi o stanju primatelja odnosno njegovoj imunoj kompetenciji kao i o vrsti i infektivnosti HBV-a (33). OBI je identificiran u 1 : 1000 do 1 : 50000 europskih DDK-a. Krvni pripravci DDK-a s OBI-om nose visoki rizik prijenosa HBV-a transfuzijom. Rizik ovisi i o prisutnosti anti-HBs-a i količini virusa. Ta činjenica može opravdati testiranje na anti-HBc i HBV DNK (34).

HBV NAT udružen s anti-HBc probirnim testiranjem može smanjiti rezidualni rizik prijenosa HBV-infekcije transfuzijom krvi (35). Od 2012. godine, 30 zemalja su implementirale HBV NAT. Zadatak jedne od studija bio je ispitati postoji li replikacija HBV-a kod HBsAg-negativnih DDK koji nemaju vidljivu bolest jetre. Zaključak je da postoji replikacija HBV-a u znatnom omjeru zdravih DDK koji imaju pozitivan anti-HBc (19 od 50, odnosno 38 %). Krv takvih DDK-a može sadržavati vrlo niske razine HBV-a bez imunološkog kompleksa i takve donacije bi trebale biti isključene za transfuziju. Činjenica je da takvi DDK nemaju bolest jetre, ali i ne upućuju na patogenost takvog okultnog HBV-a (22).

Krv koja sadrži anti-HBc bez detektabilne prisutnosti HBsAg-a može biti zarazna, a probir na anti-HBc proveden u nekim zemljama rezultirao je smanjenjem rizika pojave posttransfuzijske HBV-infekcije. U jednoj od studija, od 1026 ispitanih DDK, 80 je bilo anti-HBc pozitivno (7,8 %). Od njih 80, 5 DDK je imalo pozitivnu HBV DNK-a. Razine viremije bile su različite za svih 5 DDK. Zaključak te studije je da HBsAg probir nema dovoljnu učinkovitost u zaštiti krvnih primatelja od HBV-infekcije te da bi se trebalo uzeti u obzir testiranje DDK i na anti-HBc (8).

## 1.6. DIJAGNOSTIKA DOBROVOLJNIH DAVATELJA KRVI NA VIRUS HEPATITISA B

U 2005., 2006. i 2007. godini rutinska dijagnostika DDK na HBV sastojala se isključivo na probirnom serološkom testiranju na površinski antigen HBV-a, HBsAg. Pozitivni i nejasni rezultati slani su u Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Petrova 3, Zagreb na potvrdna serološka testiranja i PCR testiranje na HBV DNK. Anti-HBc-test rađen je cijelu 2006. godinu. Cilj mu je bio probir svih DDK koji su bili u kontaktu s HBV-om.

Danas se dijagnostika DDK dijeli na serološku i molekularnu. Probirno serološko testiranje se temelji na dokazivanju prisutnosti HBsAg-a u serumu, a molekularno probirno testiranje se temelji na ID-NAT-testu (engl. "individual donor nucleic acid amplification test") - testu amplifikacije nukleinskih kiselina svakog davatelja pojedinačno. ID-NAT je četverostruki test za dokazivanje HBV DNK, HCV RNK, HIV1 RNK I HIV2 RNK. Ukoliko je test pozitivan, rade se diskriminacijski testovi kako bi se dokazalo o kojoj se nukleinskoj kiselini radi. Pozitivitet jedne ne isključuje pozitivitet druge nukleinske kiseline.

## 1.7. PREVENCIJA I LIJEČENJE HEPATITISA B

Mjere prevencije HBV-infekcije započinju edukacijom o mjerama zaštite i izbjegavanju rizičnog ponašanja. Izuzetan doprinos zaštiti od HBV-a daje cijepljenje. U početku se cijepljenje vršilo u 6. razredu osnovne škole kao i kod novorođene djece HBsAg pozitivnih majki, a kasnije su se jedno vrijeme cijepila sva novorođena djeca. Međutim, negativan odnos prema cijepljenju doveo je do ukidanja cijepljenja sve novorođene djece u rodilištu te se cijepi samo djeca HBsAg-pozitivnih majki, zdravstveni radnici i osobe koje su moguće u kontaktu s HBV-om (obitelji HBV-pozitivnih osoba). Prevencija se provodi pravilnom sterilizacijom medicinske opreme, testiranjem donirane krvi, sjemeni i organa uz ostale mjere osiguranja sigurnosti krvi i krvnih pripravaka. Od 1999. godine radi se probir trudnica na HBV u svrhu zaštite novorođenčadi. U svrhu prevencije prijenosa HBV-a, također ulazi i rano otkrivanje i liječenje oboljelih. U prvoj liniji terapije nalaze se interferon  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ), najčešće pegilirani, tenofovir (TDF) i entekavir (ETV). Ostali čine grupu nukleozidnih analoga koji spadaju u drugu liniju liječenja HBV-infekcije: adefovir (ADV), lamivudin (LMV, Zeffix), telbivudin (LdT), emtricitabin (FTC) (36). U novije se vrijeme koristi i Hepsera. Adefovir je aktivan protiv hepadna virusa „in vitro“, uključujući sve uobičajene oblike HBV-a rezistentnog na lamivudin, mutacije povezane s famciklovirom i mutacije koje izmiču (engl. „escape mutations“) imunoglobulinima hepatitisa B te „in vivo“ na životinjskim modelima replikacije hepadna virusa (37).

## 2. CILJEVI RADA

Specifični ciljevi rada su sljedeći:

1. Istražiti broj trajno odgođenih DDK na temelju pozitivnog HBsAg-testa u 2005., 2006. i 2007. godini
2. Istražiti broj trajno odgođenih DDK na temelju pozitivnog anti-HBc-testa u 2006. godini
3. Istražiti broj trajno odgođenih DDK na temelju pozitivnog HBsAg i anti-HBc-testa u 2006. godini
4. Usporediti broj trajno odgođenih DDK za 2005., 2006. i 2007. godinu
5. Istražiti broj trajno odgođenih DDK u 2005., 2006. i 2007. godini i kategorizirati ih prema rezultatima testiranja HBV-markera, spolu i broju davanja krvi
6. Istražiti broj ID-NAT (NAT HBV) pozitivnih donacija DDK od uvođenja ID-NAT-testiranja u rutinski rad 1. 5. 2013. do kraja 2016. godine
7. Procijeniti utjecaj probira na anti-HBc u 2006. godini na pojavnost OBI-a, mutiranih oblika HBV-a i „dijagnostičkog prozora“ HBV-a kod DDK Osječko-baranjske županije nakon uvođenja ID-NAT-a 1. 5. 2013 godine



### 3. ISPITANICI I METODE

Istraživanje je dizajnirano kao presječna studija namjernog uzorka testiranih dobrovoljnih davatelja krvi i obuhvaća DDK s područja Osječko-baranjske županije. U 2005. godini testirano je 10 579 donacija krvi, 2006. godine 10 398, a 2007. godine 10 561 donacija krvi. U ovom su istraživanju upotrijebljeni rezultati serološkog enzimskog testiranja na HBsAg u 2005., 2006. i 2007. godini te rezultati serološkog enzimskog testiranja na anti-HBc protutijelo u 2006. godini. Testiranje je izvedeno iz serumskog uzorka DDK. Primarni uzorak vađen je u epruvetu Becton-Dickinson od 10 mL, bez antikoagulansa te je nakon završene koagulacije centrifugiran 10 min na 3000 okretaja u minuti. U ovom su istraživanju upotrijebljeni i rezultati ID-NAT-testiranja DDK OBŽ-a i DDK ostalih četiriju županija (Vukovarsko-srijemske, Požeško-slavonske, Brodsko-posavske i Virovitičko-podravske županije) čije je serološko testiranje DDK KZTM KBC Osijek preuzeo u razdoblju od 2011. - 2014. godine. Rezultati testiranja na anti-HBc u 2006. godini uspoređeni su pojavom OBI-a, infekcija mutiranim oblikom HBV-a ili HBV-infekcija u „dijagnostičkom prozoru“ od 1. 5. 2013. do kraja 2016. godine.

#### 3.1. DOBROVOLJNI DAVATELJ KRV

Temelj transfuzijskog liječenja su DDK odnosno njihove donacije krvi i krvni pripravci koji su iz njih proizvedeni.

DDK je osoba koja krv daje bez ikakve materijalne naknade na načelima dobrovoljnosti, besplatnosti, solidarnosti i anonimnosti. DDK mogu biti sve zdrave osobe u dobi od 18 do 65 godina za koje je liječnik pregledom i laboratorijskim ispitivanjem utvrdio da mogu dati krv bez opasnosti za svoje zdravlje ili zdravlje primatelja. Odabir davatelja krvi provodi se po strogim zakonskim regulativama (Pravilnik o krvi i krvnim pripravcima). Davatelj krvi ispunjava upitnik prije davanja krvi jer ne smije zatajiti informacije koje se od njega traže jer o njegovim iskrenim odgovorima ovisi sigurnost transfuzijskog liječenja (38).

Krvni pripravci imaju posebno mjesto među lijekovima zbog ljudskog podrijetla, načina proizvodnje i liječenja te se bitno razlikuju od lijekova proizvedenih u farmaceutskoj industriji.

Od transfuzijskog se liječenja očekuje da uvijek pomogne bolesniku i nikada ne izazove štetne posljedice (39).

#### 3.2. METODE

Probirno se serološko testiranje na prisutnost HBV-a temelji na testiranju HBsAg-a, površinskog „S“ antigena HBV-a. Osobitost probirnog testa je njegova iznimna osjetljivost, kod nekih proizvođača i do 100 %. Osjetljivost je veoma važna u probirnom testiranju kako bi se izdvojile sve donacije koje su pozitivne i suspektne na HBsAg. Uzorci pozitivnih donacija na HBsAg poslani su u HZTM, Petrova 3, Zagreb na daljnja potvrdna testiranja. Rezultati potvrdnih testiranja pokazali su radi li se o osobi pozitivnoj na HBsAg ili o nespecifičnoj reaktivnosti testa. Iznimno, uz testiranje na HBsAg, KZTM KBCO, Odjel za serološku i imunohematološku dijagnostiku DDK tijekom 2006. godine, radio je i test za dokazivanje protutijela na sržni antigen HBV-a, anti-HBc s ciljem izdvajanja svih DDK koji su bili u kontaktu s HBV-om. Za probirno su serološko testiranje na HBsAg upotrijebljeni sljedeći enzimski imuno-testovi: HBsAg Siemens 5.0 generacije, HBsAg Vitros, Ortho i HBsAg AxSYM (V2), Abbott. Za probirno je serološko testiranje na anti-HBc upotrijebljen Vitros anti-HBc test (ukupna protutijela IgM i IgG) proizvođača Ortho.

#### 3.3. PROBIRNO SEROLOŠKO TESTIRANJE NA VIRUS HEPATITISA B

Probirno serološko testiranje na HBV u 2005. i 2007. godini temeljeno je na dokazivanju prisutnosti HBsAg-a u serumu uzorka krvi DDK. U 2006. godini probirno se serološko testiranje na HBV sastojalo od testiranja na HBsAg i anti-HBc.

##### 3.3.1. PROBIRNO HBsAg SEROLOŠKO TESTIRANJE

Probirno serološko testiranje koristi testove tri proizvođača:

Prvu platformu za dijagnostiku HBsAg-a činio je test:

a) ENZYGNOST HBsAg 5.0 gen.

Proizvođač: DADE BEHRING, ILLINOIS, USA.

EIA (engl. *enzyme immunoassay*), enzimski imunotest Testiranje je rađeno na aparatu BEP 2000.

Drugu platformu za dijagnostiku HBsAg-a činio je test:

b) HBsAg (V2) AXSYM.

Proizvođač; ABBOTT, TEXAS, USA.

MEIA (engl. *microparticle enzyme immunoassay*), testiranje je rađeno na aparatu AXSYM.

Treću platformu za dijagnostiku HBsAg-a činio je test:

c) HBsAg VITROS.

Proizvođač: ORTHO, NEW JERSEY, USA.

Testiranje je rađeno na aparatu Vitros ECIQ.

Princip HBsAg testa: Jažice testa obložene su anti-HBs-protutijelima. Ukoliko je u uzorku prisutan HBsAg, on se veže za protutijela i nastaje spoj antigen-protutijelo (Ag-Pt). Kako bi spoj Ag-Pt postao vidljiv, u jažice se dodaje konjugat, protutijelo obilježeno enzimom koje se veže za spoj Ag-Pt. Dodavanjem supstrata aktivira se enzim na konjugatu. Aktivirani enzim stvara obojenje koje je upravo proporcionalno količini prisutnog HBsAg-a u serumu. Reakcija se odvija u određenom vremenu i nakon toga se zaustavlja dodavanjem sumporne kiseline. Mjerena apsorpcija uzoraka pozitivnih i negativnih kontrola služi za izračunavanje granične vrijednosti (engl. *cut-off*). Granična vrijednost označava vrijednost iznad koje je rezultat pozitivan i ispod koje je rezultat negativan. „Siva zona“ je 10 % vrijednosti ispod granične vrijednosti koja označava mogući potencijalno pozitivan rezultat. „Siva zona“ se izračunava u svrhu osiguranja što sigurnije i kvalitetnije donacije krvi odnosno njenih pripravaka (40, 41, 42).

#### INTERPRETACIJA REZULTATA

Ukoliko je rezultat pozitivan, uzorak se retestira u duplikatu istim testom. Ukoliko je rezultat retestiranja oba puta negativan, konačni rezultat testiranja je negativan. Ukoliko je rezultat retestiranja jedan put pozitivan, a drugi put negativan ili je rezultat obaju retestiranja pozitivan, konačni rezultat testiranja je pozitivan (40, 41, 42). Suspektni i pozitivni uzorci šalju se na potvrdno testiranje na HBsAg u HZTM, Petrova 3, Zagreb.

### 3.3.2. PROBIRNO SEROLOŠKO ANTI-HBc TESTIRANJE

Anti-HBc VITROS, ORTHO.

Proizvođač: ORTHO, NEW JERSEY, USA.

Testiranje je rađeno je na aparatu Vitros ECIQ.

Test za dokazivanje ukupnih protutijela IgG i IgM klase temeljen je na principu kemiluminiscencijskog kompetitivnog imunotesta. Reakcija se događa između anti-HBc-protutijela u uzorku s hepatitis B sržnim antigenom kojim su obložene jažice. Nakon ispiranja nevezanog uzorka, dodaje se konjugat, mišje monoklonalno anti-HBc protutijelo obilježeno peroksidazom hrena. Ukoliko se u uzorku nalazi anti-HBc protutijelo, ono se veže na HBcAg, a konjugat se veže s ostatkom izloženih, nevezanih HBcAg-a na površini jažica. U jažice se dodaje reagens koji sadrži luminiscentne supstrate i reagens za prijenos elektrona. Peroksidaza hrena u vezanom konjugatu katalizira oksidaciju derivata luminola proizvodeći svjetlost. Reagens za prijenos elektrona povećava razinu proizvedenog svjetla i produžava njegovu emisiju. Vitros aparat očitava svjetlosne signale. Količina vezanog konjugata peroksidaze hrena je obrnuto proporcionalna količini anti-HBc-a u uzorku (43).

### INTERPRETACIJA REZULTATA

Aparat Vitros izračunava i prikazuje vrijednost rezultata. Rezultat se izražava u odnosu signala uzorka i granične vrijednosti, cut-offa. Kod te kompetitivne metode mjerena je svjetlost koju daje protutijelo konjugirano enzimom peroksidaze vezano za HBcAg koji se nalazi na stjenkama mikrojažica. S obzirom na to da se radi o kompetitivnosti, jačina izmjerene svjetlosti obrnuto je proporcionalna količini anti-HBc-a u uzorku DDK.

Interpretacija rezultata vrši se prema Tablici 2 (43).

Tablica 2. Interpretacija rezultata testiranja na anti-HBc kompetitivnim testom i algoritam testiranja

| Inicijalni Vitros rezultat s/c | ZAKLJUČAK                               | INTERPRETACIJA                                                                                                                    |
|--------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $< 0.90$                       | REAKTIVAN                               | Vjerojatno je uzorak reaktivan na anti-HBc                                                                                        |
| $\geq 0.90$ i $\leq 1.10$      | RETESTIRATI U DUPLIKATU                 | Ako su 2 od 3 rezultata $< 1.00$ vjerojatno je uzorak reaktivan na anti-HBc                                                       |
| $\geq 0.90$ i $\leq 1.10$      | RETESTIRATI U DUPLIKATU                 | Ako su 2 od 3 rezultata $> 1.00$ i $< 4.80$ vjerojatno je uzorak negativan na anti-HBc                                            |
| $> 1.10$ i $< 4.80$            | NEGATIVAN                               | Uzorak je negativan na anti-HBc                                                                                                   |
| $\geq 4.80$                    | RAZRIJEDITI U OMJERU 120 I RETESTIRATI  | Ako je rezultat razrijeđenog i retestiranog uzorka $\leq 1.00$ vjerojatno je uzorak reaktivan na anti-HBc                         |
| $\geq 4.80$                    | RAZRIJEDITI U OMJERU 1:20 I RETESTIRATI | Ako je rezultat razrijeđenog i retestiranog uzorka u rasponu $\geq 1.00$ i $\leq 4.80$ vjerojatno je uzorak negativan na anti-HBc |

### 3.4. STATISTIČKE METODE

Podatci definirani ciljevima istraživanja kao i rezultati provedenog istraživanja prikazani su deskriptivno i tabelarno, te obrađeni deskriptivnom statistikom. Kategorijski podatci predstavljeni su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Podatci su statistički analizirani upotrebom Microsoft Office Excel tabličnog kalkulatora.

## 4. REZULTATI

Probirno serološko testiranje na HBsAg 2005., 2006. i 2007. godine i probirno serološko testiranje na anti-HBc u 2006. godini dalo je sljedeće rezultate:

Tablica 3. Prikaz broja trajno odgođenih DDK u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu KBC Osijek i Republici Hrvatskoj

|        |                      | Broj (%) DDK*                       |                       | Broj (%) DDK*                         |                    |
|--------|----------------------|-------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|--------------------|
|        |                      | TRAJNO ODGOĐENI<br>KZTM† KBC OSIJEK |                       | TRAJNO ODGOĐENI<br>REPUBLIKA HRVATSKA |                    |
| Godina | Ukupno<br>testiranih | HBsAg<br>pozitivan                  | anti-HBc<br>pozitivan | Ukupno<br>testiranih                  | HBsAg<br>pozitivan |
| 2005.  | 10579                | 4<br>(0,04)                         | nije rađeno           | 156987                                | 41<br>(0,03)       |
| 2006.  | 10398                | 6<br>(0,06)                         | 161<br>(1,55)         | 156940                                | 34<br>(0,02)       |
| 2007.  | 10561                | 6<br>(0,06)                         | nije rađeno           | 161038                                | 29<br>(0,02)       |
| ukupno | 31538                | 16<br>(0,05)                        | 161<br>(0,51)         | 474965                                | 104<br>(0,02)      |

\* - Dobrovoljni davatelj krvi

† - Klinički zavod za transfuzijsku medicinu

Zbog različitih seroloških statusa koje može imati OBI svim anti-HBc pozitivnim DDK-ima rađeni su markeri HBV-a. Prema njihovim rezultatima napravljena je podjela DDK-a prema serološkom statusu.

Tablica 4. Prikaz serološkog statusa trajno odgođenih dobrovoljnih davatelja krvi u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu KBC Osijek

| BROJ (%) TRAJNO ODGOĐENIH DDK*<br>U KZTM† KBC OSIJEK |                 |                                 |                               |                        |                                    |
|------------------------------------------------------|-----------------|---------------------------------|-------------------------------|------------------------|------------------------------------|
|                                                      |                 | anti-HBc pozitivni              |                               |                        |                                    |
| Godina                                               | HBsAg pozitivan | <i>Only anti-HBc‡</i> pozitivni | Pozitivni ostali HBV§ markeri | Ukupno                 | Pozitivni DDK* na ukupan broj DDK* |
| 2005.                                                | 4/16            | NR                              | NR                            | 4<br>(2,26)            | 10579<br>(0,04)                    |
| <b>2006.</b>                                         | <b>6/16</b>     | <b>21/21</b>                    | <b>140<br/>(100)</b>          | <b>167<br/>(94,35)</b> | <b>10398<br/>(1,61)</b>            |
| 2007.                                                | 6/16            | NR                              | NR                            | 6<br>(3,39)            | 10561<br>(0,06)                    |
| ukupno                                               | 16/16           | 21/21                           | 140<br>(100)                  | 177<br>(100)           | 31538<br>(0,56)                    |

\* – Dobrovoljni davatelji krvi

† - Klinički zavod za transfuzijsku medicinu

‡ - Pozitivan samo anti-HBc

§ - Hepatitis B virusni markeri

Tablica 5. Prikaz raspodjele trajno odgođenih dobrovoljnih davatelja krvi prema broju davanja krvi u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu KBC Osijek i Republici Hrvatskoj

| Godina i<br>ukupan<br>broj<br>DDK* | BROJ (%)TRAJNO<br>ODGOĐENIH DDK* U<br>KZTM† KBC OSIJEK |               |                | Godina i<br>ukupan<br>broj<br>DDK* | BROJ (%) TRAJNO<br>ODGOĐENIH DDK* U<br>REPUBLICI HRVATSKOJ |               |                |
|------------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------|----------------|------------------------------------|------------------------------------------------------------|---------------|----------------|
|                                    | Višestruki<br>DDK*                                     | Novi<br>DDK*  | Ukupno         |                                    | Višestruki<br>DDK*                                         | Novi<br>DDK*  | Ukupno         |
| 2005.<br>10579                     | 3<br>(0,028)                                           | 1<br>(0,009)  | 4<br>(0,038)   | 2005.<br>156987                    | 12<br>(0,008)                                              | 29<br>(0,018) | 41<br>(0,026)  |
| 2006.<br>10398                     | 155<br>(1,491)                                         | 12<br>(0,115) | 167<br>(1,606) | 2006.<br>156940                    | 8<br>(0,005)                                               | 26<br>(0,017) | 34<br>(0,022)  |
| 2007.<br>10561                     | 2<br>(0,019)                                           | 4<br>(0,038)  | 6<br>(0,057)   | 2007.<br>161038                    | 8<br>(0,005)                                               | 21<br>(0,013) | 29<br>(0,018)  |
| UKUPNO<br>31538                    | 160<br>(0,507)                                         | 17<br>(0,054) | 177<br>(0,561) | UKUPNO<br>474965                   | 28<br>(0,006)                                              | 76<br>(0,016) | 104<br>(0,022) |

\* - Dobrovoljni davatelji krvi

† - Klinički zavod za transfuzijsku medicinu



Tablica 6. Prikaz raspodjele trajno odgođenih dobrovoljnih davatelja krvi prema spolu u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu KBC Osijek i Republici Hrvatskoj

| BROJ (%) TRAJNO ODGOĐENIH DDK* |                       |                      |                       |                        |                      |                      |                      |
|--------------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                                | KZTM† KBC OSIJEK      |                      |                       |                        | REPUBLIKA HRVATSKA   |                      |                      |
| Godina<br>broj<br>DDK*         | Muškarci              | Žene                 | Ukupno                | Godina<br>broj<br>DDK* | Muškarci             | Žene                 | Ukupno               |
| 2005.<br>10579                 | <b>4</b><br>(0,038)   | <b>0</b>             | <b>4</b><br>(0,038)   | 2005.<br>156987        | <b>31</b><br>(0,020) | <b>10</b><br>(0,006) | <b>41</b><br>(0,026) |
| 2006.<br>10398                 | <b>146</b><br>(1,404) | <b>21</b><br>(0,202) | <b>167</b><br>(1,606) | 2006.<br>156940        | <b>28</b><br>(0,018) | <b>6</b><br>(0,004)  | <b>34</b><br>(0,022) |
| 2007.<br>10561                 | <b>6</b><br>(0,057)   | <b>0</b>             | <b>6</b><br>(0,057)   | 2007.<br>161038        | <b>21</b><br>(0,013) | <b>8</b><br>(0,005)  | <b>29</b><br>(0,018) |
| UKUPNO<br>31538                | 156<br>(0,495)        | 21<br>(0,067)        | 177<br>(0,561)        | UKUPNO<br>474965       | 80<br>(0,017)        | 24<br>(0,005)        | 104<br>(0,022)       |

\* - Dobrovoljni davatelji krvi

† - Klinički zavod za transfuzijsku medicinu

Tablica 7. Prikaz broja dobrovoljnih davatelja krvi s okultnom hepatitis B virusnom infekcijom u Republici Hrvatskoj i Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu KBC Osijek

| BROJ (%) DDK*           |                    |                |                  |                              |                            |                            |                   |
|-------------------------|--------------------|----------------|------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------|
|                         | ID-NAT†            |                |                  |                              | anti-HBc                   |                            |                   |
|                         |                    |                |                  |                              | probir                     | bez probira                |                   |
| Godina                  | Republika Hrvatska | Broj OBI‡ u RH | KZTM§ KBC Osijek | Broj OBI‡ u KZTM§ KBC Osijek | Osječko-baranjska županija | Osječko-baranjska županija | Ostale 4 županije |
| 1.5.2013. - 31.12.2013. | 147 664            | 21<br>(0,014)  | 15884            | 4<br>(0,025)                 | <b>0</b>                   | 0                          | 4<br>(0,025)      |
| 2014.                   | 182 611            | 17<br>(0,009)  | 26964            | 2<br>(0,007)                 | <b>0</b>                   | 1<br>(0,004)               | 1<br>(0,004)      |
| 2015.                   | 195 177            | 10<br>(0,005)  | 29265            | 2<br>(0,007)                 | <b>0</b>                   | 0                          | 2<br>(0,007)      |
| 2016                    | 196 988            | 2<br>(0,001)   | 29004            | 0                            | <b>0</b>                   | 0                          | 0                 |
| UKUPNO                  | 722 440            | 50<br>(0,007)  | 101117           | 8<br>(0,008)                 | <b>0</b>                   | 1<br>(0,001)               | 7<br>(0,007)      |

\* - Dobrovoljni davatelji krvi

† - Pojedinačni test amplifikacije nukleinskih kiselina davatelja krvi

‡ - Okultna hepatitis B virusna infekcija

§ - Klinički zavod za transfuzijsku medicinu

|| - Vukovarsko-srijemska, Požeško-slavonska, Brodsko-posavska i Virovitičko-podravsko županija

## 5. RASPRAVA

Dobrovoljni davatelji krvi dolaze dati krv smatrajući se potpuno zdravima. Ipak, nakon probirnog serološkog testiranja na HBsAg, pronađe se određeni broj HBsAg-pozitivnih dobrovoljnih davatelja krvi. Najčešće dobrovoljni davatelj krvi ne zna da ima hepatitis B jer ima vrlo blage simptome ili ih uopće nema. Iako su sve HBsAg-pozitivne donacije bile izdvojene i propisno zbrinute, u svijetu je i dalje bio zabilježen nemali broj postransfuzijskih hepatitisa. Neprestano se postavljalo pitanje načina prijenosa hepatitis B virusne infekcije s obzirom na negativan rezultat HBsAg-a. Otkrićem ljudske deoksiribonukleinske kiseline (DNK) i tehnologije lančane reakcije polimeraze (*polymerase chain reaction - PCR*) širom su se otvorila vrata novim spoznajama. Otkriveno je da virus hepatitisa B ima deset puta veću razinu mutacija genoma od drugih DNK virusa te da postoje dobrovoljni davatelji krvi koji imaju negativan rezultat HBsAg-testa i vrlo slabu replikaciju HBV DNK, dobrovoljni davatelji krvi s okultnom hepatitis B virusnom infekcijom (OBI) (2, 3). Otkriveni su i dobrovoljni davatelji krvi s mutiranim oblicima hepatitis B virusa, najčešće površinskog S antigena, koji uz negativan HBsAg-test imaju standardnu razinu HBV DNK u serumu (3, 7, 14). Vrlo je važna i spoznaja da testiranje PCR tehnologijom uvelike skraćuje „dijagnostički prozor“ hepatitis B virusa te da sa sigurnošću dokazuje HBV DNK u uzorku i kod mutiranih oblika hepatitis B virusa (33). PCR-testiranje je u početku bilo vrlo skupo i tehnički zahtjevno i bilo je jasno kako se neće moći raditi rutinski. Iako se došlo do važnih spoznaja, i dalje je postojala mogućnost prijenosa HBV-a. Međutim, u tom je razdoblju otkrivena važna činjenica: kod svih je oblika HBV-infekcije uočena jedna konstanta, pozitivan rezultat protutijela na sržni antigen HBV-a: anti-HBc (3, 12-14). To je protutijelo najdugovječnije, dobar je prediktor i sigurni pokazatelj kontakta s HBV-om (11). Svjesni činjenice mogućeg prijenosa HBV-a, unatoč negativnom HBsAg-testu, Klinički zavod za transfuzijsku medicinu KBC Osijek, 2006. godine svim dobrovoljnim davateljima krvi uz HBsAg-test rutinski radi i ukupni anti-HBc-test. Iako testiranje na anti-HBc nije bilo zakonski obvezno, Predstojnica Klinike zaključila je kako je stručno opravdano jer je u granicama mogućnosti Kliničkog zavoda može djelovati na smanjenje rizika prijenosa HBV-a. Anti-HBc-test rađen 2006. godine bio je prvi veliki probir dobrovoljnih davatelja krvi koji su bili u kontaktu s HBV-om. Osobe s pozitivnim anti-HBc-testom i/ili anti-HBs i anti-HBe-testom mogle su

pripadati skupini osoba koje imaju riješenu HBV-infekciju, OBI, lažno pozitivan anti-HBc ili su bile u razdoblju rješavanja akutne infekcije (12, 13). Iako se na temelju pozitivnog rezultata anti-HBc-testa nije moglo reći o kojoj se skupini radi, važna je činjenica da su svi dobrovoljni davatelji krvi bili u kontaktu s HBV-om i da su mogući prenositelji HBV-a.

U 2006. godini uočen je približno jednak broj HBsAg-pozitivnih kao i godinu prije i godinu poslije, a na temelju anti-HBc-pozitivnog testa, trajno je odgođen 161 dobrovoljni davatelj krvi. Prema studijama, vrlo je važna činjenica bila da dobrovoljni davatelj krvi s pozitivnim anti-HBc testom i/ili anti-HBs i anti-HBe testom, „anti-HBc only“ pa čak i dobrovoljni davatelj krvi s negativnim HBV-markerima i negativnom HBV DNK (izmjena faze detekcije i latencije) mogu prenijeti HBV (3, 9, 32). Iz tog je razloga za daljnju dijagnostiku bilo važno napraviti i ostale HBV-markere, ponajviše anti-HBs i anti-HBe. Prateći rezultate studija u to vrijeme, ustanovljeno je da anti-HBc serološki test poput „zlatnog standarda“ u otkrivanju kontakta s HBV-om (3, 11-14).

Prevalencija anti-HBc-a 2006. godine (bez osoba s pozitivnim HBsAg-om) iznosila je 1,55 % i bila je približna prevalencijama anti-HBc-a u susjednim zemljama, dok je prevalencija anti-HBc-pozitivnih u zemljama niskog ekonomskog statusa veća (8, 20, 21, 23, 24, 25). Rasprostranjenost HBV-a je također puno veća te je samim time veći i broj ljudi koji je došao u kontakt s HBV-om, što se odnosi i na dobrovoljne davatelje krvi (Egipat 7,8 %, Pakistan 17,28 %). Povezanost između pozitivnog anti-HBc-testa i OBI-a odnosno mutiranih oblika HBV-a višestruko je dokazana u studijama (3, 8, 12-14, 17, 21, 22, 24-26). Prevalencija HBV DNK-pozitivnih u populaciji anti-HBc-pozitivnih DDK općenito iznosila je od 0 do 15 % (19). OBI je identificiran u 1 : 1000 do 1 : 50 000 europskih dobrovoljnih davatelja krvi (34). Prevalencija OBI kod dobrovoljnih davatelja krvi u Južnoj Koreji prema međunarodnom istraživanju 2008. godine procjenjuje se na 8,55 na milijun donacija, u Pakistanu jedan od 200 DDK koji su anti-HBc-pozitivni, HBsAg-negativni i HBV DNK-negativni ima OBI (19, 21).

U Japanu je dokazano da postoji replikacija HBV-a u znatnom omjeru zdravih DDK koji imaju pozitivan anti-HBc (22). Druga studija je pokazala da je od 1026 ispitanih DDK, kod 80 anti-HBc-pozitivnih (7,8 %) 5 DDK imalo pozitivnu HBV DNK. Dokazana je prisutnost HBV DNK u jetrenom tkivu u 24 od 33 zdravih DDK (72,7 %), 5 od 30 anti-HBc-pozitivnih primatelja (16,7 %) (8). U međuvremenu, na svjetskoj se razini radilo PCR-testiranje u minipulovima uzoraka DDK. Iako se u početku smatralo da je pronađen način kako smanjiti troškove testiranja,

a testirati sve dobrovoljne davatelje krvi PCR-metodom na HBV DNK, uočeni su nedostaci tog načina testiranja. Najčešće je razrjeđenje uzorka bilo preveliko za prisutnu nisku razinu HBV DNK te je rezultat testiranja često bio lažno negativan (30). Sedam godina kasnije, tehnologija je znatno uznapredovala i pronađeno je kvalitetno rješenje. Od 2012. godine, 30 je zemalja implementiralo ID-NAT (HBV NAT). U Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu KBC Osijek od 1. 5. 2013. godine uvodi se ID-NAT koji je u početku služio za detekciju HBV DNK, HCV RNK i HIV1 RNK (triplex test), a kasnije i HIV2 RNK u pojedinačnom uzorku dobrovoljnih davatelja krvi. Uzorke za ID-NAT svih svojih dobrovoljnih davatelja krvi kao i dobrovoljnih davatelja krvi ostalih četiriju županija koje je preuzeo 2011. - 2014. godine, Klinički zavod za transfuzijsku medicinu KBC Osijek svakodnevno je slao u Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Petrova 3, Zagreb na ID-NAT testiranja. Na svjetskoj su razini uočene prednosti ID-NAT-a. Odličan je za dijagnostiku HBV-a u „dijagnostičkom prozoru“, smanjio ga je s 40-ak na svega 15 dana. Pokazao se odličnim u otkrivanju mutiranih oblika HBV-a. S obzirom na to da dokazuje samu HBV DNK, u rezultatu nije bilo pogreške, bez obzira na vrstu mutacije (33).

Usporedivši prevalenciju anti-HBc-pozitivnih novih dobrovoljnih davatelja krvi kod nas i one u Italiji, uzevši u obzir činjenicu da je prijenos OBI-a kod anti-HBc „only“ oko 3 %, vidljivo je da je mogućnost prijenosa OBI-a u našem slučaju vrlo mala, ali ne i zanemariva (25). Odbijeno je 155 višestrukih dobrovoljnih davatelja krvi (1,49 %) što čini znatno veći broj mogućih prijenosa HBV-a iz razloga višestrukih davanja krvi tijekom godine dana (3 - 4 po davatelju krvi). Broj trajno odgođenih dobrovoljnih davatelja krvi 2006. godine povećan je (161) u odnosu na 2005. i 2007. godinu. Gubitak broja dobrovoljnih davatelja krvi nakon probira na anti-HBc u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu KBC Osijek bio je velik i svakako je utjecao na ukupan broj trajno odgođenih DDK. Važno je napomenuti da su dobrovoljni davatelji krvi s područja Osječko - baranjske županije 2006. godine probirani na anti-HBc, dok dobrovoljni davatelji krvi s područja ostalih četiriju županija čije je probirno serološko testiranje preuzeo Klinički zavod za transfuzijsku medicinu KBC Osijek 2011. - 2014. godine, nisu bili testirani na anti-HBc. Iz rezultata testiranja ID-NAT-om vidljivo je da je svih 7 višestrukih dobrovoljnih davatelja krvi kod kojih je otkrivena okultna hepatitis B virusna infekcija pripadaju tim županijama osim jednog novog dobrovoljnog davatelja krvi s područja Osječko – baranjske županije koji je prvi puta dao krv.

Iz tih je rezultata vidljivo da je probir dobrovoljnih davatelja krvi u Osječko – baranjskoj županiji rađen 2006. godine trajno odgodio sve dobrovoljne davatelje krvi koji su bili u kontaktu s HBV-om. Direktno je utjecao na nepojavnost okultnih hepatitis B virusnih infekcija među dobrovoljnim davateljima krvi Osječko – baranjske županije jer nije zabilježen niti jedna okultna – hepatitis B virusna infekcija, iako je prošlo više od 6 godina. Istovremeno, niti jedna infekcija mutiranim oblikom HBV-a ili infekcija u „dijagnostičkom prozoru“ nije zabilježena.

Probir anti-HBc-pozitivnih donacija 2006. godine i uvođenje ID-NAT-a 2015. godine, uveliko su podigli kvalitetu krvnih pripravaka i općenito transfuzijskog liječenja.

Sada se stalno postavlja pitanje: Može li ID-NAT zamijeniti probirna serološka testiranja na HBsAg i/ili anti-HBc? ID-NAT je svakako odličan u dijagnostici trenutne HBV-infekcije (akutne ili kronične), mutiranih oblika HBV-a i infekcije za vrijeme „dijagnostičkog prozora“. Međutim, za dijagnostiku OBI-a koji može biti seropozitivan ili seronegativan odnosno može imati ID-NAT pozitivan ili negativan, vrlo je važna dijagnostika anti-HBc-a. Rizik od HBV DNK pozitivne donacije OBI-a 100 puta je veći od procijenjenog preostalog rizika povezanog s „dijagnostičkim prozorom“ HBV-infekcije (29).

## 6. ZAKLJUČCI

1. Približan broj dobrovoljnih davatelja krvi u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu KBC Osijek imao je pozitivan rezultat HBsAg-testa u 2005., 2006. i 2007. godini. Rezultati Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu KBC Osijek prate hrvatski prosjek.
2. Testiranje krvi na anti-HBc tijekom 2006. godine povećalo je broj trajno odgođenih davatelja u odnosu na godinu prije i godinu poslije kao i u odnosu na broj trajno odgođenih u Republici Hrvatskoj.
3. Probir na anti-HBc u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu KBC Osijek utjecao je na smanjenje ukupnog broja aktivnih dobrovoljnih davatelja krvi.
4. Većinu anti-HBc trajno odgođenih činili su dobrovoljni davatelji krvi koji su uz anti-HBc imali pozitivne i ostale HBV-markere (140/10398), dok je *anti-HBc only* dobrovoljnih davatelja krvi bilo 21.
5. U 2005., 2006. i 2007. godini većinu dobrovoljnih davatelja krvi čine muškarci koji krv daju višestruko te su sukladno tome trajno odgođeni dobrovoljni davatelji krvi većinom muškarci, višestruki davatelji krvi.
6. Sve utvrđene okultne hepatitis B virusne infekcije višestrukih dobrovoljnih davatelja krvi su iz županija koje nisu prošle probir na anti-HBc.
7. Jedna okultna hepatitis B virusna infekcija u Osječko-baranjskoj županiji pronađena je kod novog dobrovoljnog davatelja krvi koji također nije prošao probir na anti-HBc.
8. U skupini dobrovoljnih davatelja krvi koji su prošli probir na anti-HBc nije bilo okultnih hepatitis B virusnih infekcija što upućuje na to da je probir na anti-HBc povezan s nepojavnošću okultnih hepatitis B virusnih infekcija u populaciji dobrovoljnih davatelja krvi.
9. Nakon rutinskog testiranja ID-NAT-om tijekom 2013., 2014., 2015. i 2016. godine pojava okultnih hepatitis B virusnih infekcija ima tendenciju pada.
10. Izdvajanjem donacija krvi pozitivnih na HBsAg i anti-HBc smanjena je i onemogućena njihova uporaba te je spriječen mogući prijenos bilo kojeg oblika HBV-infekcije.
11. Uvođenjem ID-NAT-a poboljšana je kvaliteta transfuzijskih pripravaka.

## 7. SAŽETAK

### CILJ

Na temelju činjenice da je anti-HBc siguran pokazatelj kontakta s HBV-om, KZTM KBC Osijek uvodi anti-HBc test kako bi smanjio rezidualni rizik prijenosa HBV-a transfuzijom.

### NACRT STUDIJE

Presječna studija.

### ISPITANICI I METODE

S obzirom na moguće različite serološke statuse OBI-a, 2006. godine svi su DDK testirani na HBsAg i anti-HBc. Svim pozitivnim uzorcima DDK su učinjeni HBV-markeri.

### REZULTATI

Svi anti-HBc-pozitivni DDK (161/10398) uz HBsAg-pozitivne DDK (6/10398), trajno su odgođeni. Većinu anti-HBc trajno odgođenih činili su DDK koji su uz anti-HBc imali pozitivne i ostale HBV-markere (140/10398), dok je „anti-HBc only“ DDK bilo 21. Većinu trajno odgođenih DDK činili su muškarci, višestruki DDK. Od 1. 5. 2013. godine, kada je uvedeno rutinsko testiranje na ID-NAT u KZTM KBC Osijek do kraja su godine otkrivena četiri OBI-a, 2014. i 2015. godine po dva, a 2016. godine niti jedan. Značajno je da je 7 OBI-a otkriveno kod DDK iz županija koje nisu prošle probir na anti-HBc. Radi se o respektabilnom broju u tri i pol godine s obzirom na to da se radi o višestrukim DDK koji krv daju najčešće 3 - 4 puta godišnje. OBI je imao jedan DDK OBŽ-a koji je prvi puta dao krv.

### ZAKLJUČAK

Iz rezultata je vidljivo kako je probir DDK OBŽ-a rađen 2006. godine trajno odgodio sve DDK koji su bili u kontaktu s HBV-om. Utjecao je na nepojavnost OBI-a među DDK OBŽ-a jer nije zabilježen niti jedan OBI, iako je od probira prošlo više od 6 godina. Anti-HBc-test je potvrdio svoju učinkovitost i važnost uporabe u cilju smanjivanja rezidualnog rizika prijenosa HBV-a.



Ključne riječi: dobrovoljni davatelj krvi, okultna HBV infekcija, anti-HBc, ID-NAT, transfuzija krvi

## 8. SUMMARY

### OBJECTIVES

Based on the fact that anti-HBc is a proven indicator of HBV contact, Clinical Department of Transfusion Medicine at Clinical Hospital Center Osijek introduced anti-HBc test to reduce the residual risk of HBV transfusion.

### STUDY DESIGN

Cross-sectional study.

### PARTICIPANTS AND METHODS

In 2006., given the possible different OBI serological status, all voluntary blood donors have been tested for HBsAg and anti-HBc. All positive samples of voluntary blood donors have also been tested for HBV markers.

### RESULTS

All anti-HBc positive blood donors (161/10398) and HBsAg positive blood donors (6/10398) were permanently deferred. The majority of anti-HBc permanently deferred blood donors also had positive HBV markers (140/10398) along with anti-HBc (140/10398), while there were 21 “anti-HBc only” blood donors. Majority of permanently deferred blood donors were male, multiple blood donors. From 1<sup>st</sup> May 2013, when the routine ID-NAT test was introduced at Clinical Hospital Center Osijek, to the end of the year, only four OBIs were found, in 2014 and 2015 there were two, and in 2016 none. Significantly, seven OBIs were detected in blood donors from counties that did not introduce anti-HBc screening. It is a respectable number in three and a half years since it usually multiple blood donor gives blood 3 to 4 times a year. OBI was also found in one first-time blood donor in Osijek-Baranya County.

### CONCLUSION

From the results it is evident that the screening in 2006 in Osijek –Baranya County resulted in permanent deferral of all blood donors who were in contact with HBV. It has **directly** influenced

the lack of OBI among blood donors in the County, since no OBI has been recorded, although more than 6 years have passed. The anti-HBc test confirmed its effectiveness and its importance in reducing the residual risk of HBV transmission.

Keywords: voluntary blood donor, occult HBV infection, anti-HBc, ID-NAT, blood transfusion

## 9. LITERATURA

1. WHO. Hepatitis B, Dostupno na adresi: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>. Datum pristupa: 12.03.2018.
2. Bradarić N, Vucelić B. Hepatitis B. 122. Medicus 2006. Vol. 15, No. 1, 121 – 130. Dostupno na adresi: <https://hrcak.srce.hr/file/29338>. Datum pristupa: 12.03.2018.
3. Burek V. Dijagnostika virusnih hepatitisa. Vol 4, Broj 15, 7. srpnja 2008. Dostupno na adresi: <https://hcjz.hr/index.php/hcjz/article/viewFile/977/935>. Datum pristupa: 12.03.2018.
4. Ganem D, Prince AM, Hepatitis B virus infection – Natural history and clinical consequences. N Engl J Med 2004; 350: 1118-29.
5. Lesnikar V. Prevencija hepatitisa B i hepatitisa C. Acta Med Croatica 2005; 59: 383-8
6. Mimms LT, Mosley JW, HoolingerFB, Aach RD, Stevens CE, Cunningham M, i sur. Effect of concurrent acute infection with hepatitis C virus on acute hepatitis B virus infection. BMJ.1993 Oct 30; 307 (6912): 1095-7
7. Aragri M, Alteri C, Battisti A, Di Carlo D, Minichini C, Sagnelli C, i sur. Multiple Hepatitis B Virus (HBV) Quasispecies and Immune-Escape Mutations Are Present in HBV Surface Antigen and Reverse Transcriptase of Patients Withs Acute Hepatitis B. J Infect Dis. 2016 Jun 15;213(12:1897-905. doi:10.1093/infdis/jiw049. Epub 2016 Feb 9.
8. Antar W, El-Shokry MH, Abd El Hamid WA, Helmy MF. Significance of detecting anti-HBc among Egyptian male blood donors negative for HBsAg. Transfus Med. 2010 Dec;20(6):409-13. doi: 10.1111/j.1365-3148.2010.01021.x
9. Arraes LC, Ximenes R, Andrieu JM, Lu W, Barreto S, Pereira LM, i sur. The biological meaning of anti-HBC positive result in blood donors: relation to HBV-DNA and to other serological markers. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2003 May-Jun;45(3):137-40. Epub 2003 Jul 8.
10. Capsid protein – HBcAg. Dostupno na adresi: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q03732>
11. Hoofnagle JH, Gerety RJ, Barker LF. Antibody to hepatitis B virus core in man. Lancet. 1973 Oct 20;2(7834):86973.

12. Gessoni G, Beggio S, Barin P, Favarato M, Galli C, Valverde S, i sur. Significance of anti-HBc only in blood donors: a serological and virological study after hepatitis B vaccination. *Blood Transfus.* 2014 Jan;12 Suppl 1:s63-8. doi: 10.2450/2013.0227-12. Epub 2013 Feb 21.
13. Katsurada A, Marusawa H, Uemoto S, Kaburagi A, Tanaka K, Chiba T. Circulating antibody to hepatitis B core antigen does NOT always reflect the latent hepatitis B virus infection in the liver tissue. *Hepatology Res.* 2003 Feb;25(2):105-114.
14. Alhababi F, Sallam Ta, Tong CY. The significance of “anti-HBc only” in the clinical virology laboratory. *J Clin Virol.* 2003 Jul;27(2):162-9.
15. Elkady A, Iijima S, Aboulfotuh S, Mostafa Ali E, Sayed D, Abdel-Aziz NM, i sur. Characteristics of escape mutations from occult hepatitis B virus infected patients with hematological malignancies in South Egypt. *World J Hepatol.* 2017 Mar 28;9(9): 477-486.
16. Satake M, Taira R, Yugi H, i sur. Infectivity of blood components with low hepatitis B virus DNA levels identified in a lookback program. *Transfusion* 2007;47:1197-1205
17. Hoofnagle JH, Gerety RJ, Ni LY, Barker LF. Antibody to Hepatitis B Core Antigen – A Sensitive Indicator of Hepatitis B Virus Replication. *N Engl J Med* 1974; 290:1336-1340
18. Allain JP, Hewitt PE, Tedder RS, Williamson LM. Evidence that anti-HBc but not HBV DNA testing may prevent some HBV transmission by transfusion. *Br J Haematol.* 1999 Oct;107(1):186-95.
19. Seo DH, Whang DH, Song EY, Han KS. Occult hepatitis B virus infection and blood transfusion. *World J Hepatol.* 2015 Mar 27;7(3):600-6. doi: 10.4254/wjh.v7.i3.600.
20. Christensen PB, Titlestad IL, Homburg KM, Georgsen J, Kristensen T. Hepatitis B core antibodies in Danish blood donors: a surrogate marker of risk behaviour. *Vox Sang.* 2001 Nov;81(4):222-7.
21. Bhatti FA, Ullah Z, Salamat N, Ayub M, Ghani E. Anti-hepatitis B core antigen testing, viral markers, and occult hepatitis B virus infection in Pakistani blood donors: implications for transfusion practice. *Transfusion.* 2007 Jan;47(1):74-9.
22. Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, i sur. Frequent presence of HBV in the sera of HBs-Ag negative, anti-HBc-positive blood donors. *Transfusion* 2001 Sep;41(9):1093-9.

23. Allain JP, Reeves I, Kitchen AD, Wenham D, Williamson LM. Feasibility and usefulness of an efficient anti-HBc screening programme in blood donors. *Transfus Med*. 1995 Dec;5(4):259-65.
24. Van de Laar TJ, Marijt-van der Kreek T, Molenaar-de Backer MW, Hogema BM, Zaaijer HL. The yield of universal antibody to hepatitis B core antigen donor screening in the Netherlands, a hepatitis B virus low-endemic country. *Transfusion*. 2015 Jun;55(6):1206-13. doi: 10.1111/trf.12962. Epub 2014 Dec 15.
25. Manzini P, Girotto M, Borsotti R, Giachino O, Guaschino R, Lanteri M, i sur. Italian blood donors with anti-HBc and occult hepatitis B virus infection. *Haematologica*. 2007 Dec;92(12):1664-70.
26. Seed CR, Kiely P. A method for estimating the residual risk of transfusion-transmitted HBV infection associated with occult hepatitis B virus infection in a donor population without universal anti-HBc screening. *Vox Sang*. 2013 Nov;105(4):290-8. doi: 10.1111/vox.12060. Epub 2013 Jun 27.
27. Zheng X, Ye X, Du P, Zeng J, Zhu W, Yang B, i sur. High prevalence of anti hepatitis B core antigen in hepatitis B virus-vaccinated Chinese blood donors suggests insufficient protection but little threat to the blood supply. *Transfusion*. 2015 Apr;55(4):890-7. doi: 10.1111/trf.12902. Epub 2014 Nov 2.
28. Grob P, Jilg W, Bornhak H, Gerken G, Gerlich W, Günther S, i sur. Serological pattern “anti-HBc alone”: report on a workshop. *J Med Virol*. 2000 Dec;62(4):450-5.
29. Kuhns MC, Busch MP. New strategies for blood donor screening for hepatitis B virus: nucleic acid testing versus immunoassay methods. *Mol Diagn Ther*. 2006;10(2):77-91.
30. Kleinman SH, Kuhns MC, Todd DS, Glyyy SA, McNamara A, DiMarco A, i sur. Retrovirus Epidemiology Donor Study. Frequency of HBV DNA detection in US blood donors testing positive for the presence of anti-HBc: implications for transfusion transmission and donor screening. *Transfusion*. 2003 Jun;43(6):696-704.
31. Serologic and Virologic Markers of Hepatitis B Virus Infection. Dostupno na adresi: <http://www.hepwebstudy.org/modules/hepB/clinicaldiagnosis/serologic-and-virologic-markers-hepatitis-b-virus-infection>. Datum pristupa: 29.4.2018.

32. Hennig H, Puchta I, Luhm J, Schlenke P, Goerg S, Kirchner H. Frequency and load of hepatitis B virus DNA in first time blood donors with antibodies to hepatitis B core antigen. *Blood*. 2002 Oct 1;100(7):2637-41.
33. Slavulj B. Okultna hepatitis B virusna infekcija u dobrovoljnih davatelja krvi. Završni rad 2014.
34. Allain JP, Mihaljevic I, Gonzalez-Fraile MI, Gubbe K, Holm-Harritshøj L, Garcia JM, i sur. Infectivity of blood products from donors with occult hepatitis B virus infection. *Transfusion*. 2013 Jul;53(7):1405-15. doi: 10.1111/trf.12096. Epub 2013 Jan 30.
35. Roth WK, Weber M, Petersen D, Drosten C, Buhr S, Sireis W, i sur. NAT for HBV and anti-HBc testing increase blood safety. *Transfusion*. 2002 Jul;42(7):869-75.
36. Bradarić N, Bradarić I, Kuzmičić N. Hepatitis B: Koga liječiti? *Acta Med Croatica*, 67 (2013) 311-318.
37. Hepsera, INN-adefovirdipivoxil. Dostupno na adresi:  
[https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2016/20160208134126/anx\\_134126\\_hr.pdf](https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2016/20160208134126/anx_134126_hr.pdf). Datum pristupa: 9.4.2018.
38. Balen S. Osnove transfuzijske medicine, Osijek: Medicinski fakultet Osijek; 2010. str. 17-19.
39. Samardžija M. Krvlju prenosive bolesti, Osijek: Medicinski fakultet Osijek; 2011. str. 16-36.
40. Enzygnost HBsAg 5.0. Centre for Evidence-based Purchasing. Dostupno na adresi:  
[nhs.uk/cebp/useconnect.co.uk/ShowDocument.ashc?id=489&i=true](https://nhs.uk/cebp/useconnect.co.uk/ShowDocument.ashc?id=489&i=true). Datum pristupa: 09.04.2018.
41. HBsAg2.pdf. Dostupno na adresi: <http://www.ilexmedical.com/files/PDF/HBsAg2.pdf>. Datum pristupa: 12.02.2018.
42. Laboratory Procedure Manual Analyte: Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg). Dostupno na adresi: [https://wwwn.cdc.gov/nchs/data/nhanes/2007-2007/labmethods/hepb\\_d\\_hepatitis\\_b\\_surface\\_antigen\\_met.pdf](https://wwwn.cdc.gov/nchs/data/nhanes/2007-2007/labmethods/hepb_d_hepatitis_b_surface_antigen_met.pdf). Datum pristupa: 12.02.2018.
43. Hepatitis B Core Antibody – CDC. [https://wwwn.cdc.gov/nchs/data/nhanes/2011-2012/labmethods/hepb\\_d\\_g\\_met\\_hepatitis-b-core-antibody.pdf](https://wwwn.cdc.gov/nchs/data/nhanes/2011-2012/labmethods/hepb_d_g_met_hepatitis-b-core-antibody.pdf). Datum pristupa: 13.02.2018.

## 10. ŽIVOTOPIS

### **OSOBNİ PODATCI**

Ime i prezime:                      Blaženka Slavulj  
Datum i mjesto rođenja:        18. prosinac 1968., Ivanovac  
Adresa stanovanja:              Duga ulica 118, Ivanovac  
E - mail:                              [slavulj.blazenska@kbo.hr](mailto:slavulj.blazenska@kbo.hr)  
                                             slavulj.blazenska@gmail.com

### **OBRAZOVANJE**

1975. – 1983. - osnovno obrazovanje, OŠ „Moša Pijade“, Ivanovac, Antunovac  
1983. – 1987. - „ŠC Ruđer Bošković“, Osijek; smjer: sanitarno-laboratorijski stručni radnik  
1998.                      - četveromjesečni tečaj transfuzijske medicine u Hrvatskom zavodu za  
                                             transfuzijsku medicinu, Petrova 3, Zagreb  
2011. – 2014. – Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek,  
                                             Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

### **ČLANSTVA**

Član Hrvatske komore zdravstvenih radnika

### **STRUČNE AKTIVNOSTI**

1987. Položen stručni ispit za zvanje sanitarno-laboratorijskog stručnog radnika  
a) Simpoziji/konferencije:  
- Osijek, 29. studenog 2008. „Simpozij povodom 20. godišnjice Svjetskog dana borbe protiv  
  AIDS-a“ (aktivni učesnik)



- Osijek, 4. prosinca 2009. „Simpozij povodom Svjetskog dana borbe protiv AIDS-a“ s međunarodnim sudjelovanjem
- Osijek, 8. prosinca 2010. „Simpozij povodom Svjetskog dana borbe protiv AIDS-a“ s međunarodnim sudjelovanjem (aktivni učesnik)

b) Kongresi:

- Šibenik, 21. - 24. travnja 2008. 1. Međunarodni kongres HDSMARIST-a (aktivni učesnik)
- Šibenik, 14. - 17. travnja 2011. 4. Međunarodni kongres HDSMARIST-a

2014. Položen stručni ispit za zvanje prvostupnika Medicinsko laboratorijske dijagnostike

## **PUBLIKACIJE**

Objavljeni sažetci radova u knjigama sažetaka (aktivno sudjelovanje s prezentacijom):

- „Testiranja na HIV u KB Osijek“, Simpozij povodom 20. godišnjice Svjetskog dana borbe protiv AIDS-a, Osijek, 2008. Hrvatska laboratorijska udruga, Medicinski fakultet sveučilišta u Osijeku
- „Sve što ste željeli pitati o krvnim grupama i krvlju prenosivim bolestima“, plakat, 1. Međunarodni kongres HDSMARIST-a, Šibenik, 21. - 24. travnja 2008. HDSMARIST
- „Serološka dijagnostika HIV-a“, 4. Međunarodni kongres HDSMARIST-a, Šibenik, 14. - 17. travnja 2011. HDSMARIST pod pokroviteljstvom Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi Republike Hrvatske