

Praktyczne aspekty pomiaru stężenia antygeny HBs

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

Practical aspects of HBsAg quantification. Data presented at the seminar “Advances in blood donor screening” (Warsaw, 5–6 October 2015)

Jerzy Jaroszewicz

Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Streszczenie

Stężenie antygeny HBs jest ważnym klinicznie wskaźnikiem aktywności zakażenia HBV. Jest dotychczas jedynym opracowanym nieinwazyjnym markerem aktywności cccDNA oraz intensywności zakażenia hepatocytów. Dynamiczny spadek stężenia tego wskaźnika, niezależnie od rodzaju prowadzonej terapii, jest korzystnym rokowniczo markerem wskazującym na szansę utraty HBsAg. Jest to prawdziwe zarówno w stosunku do aktualnych, jak i przyszłych terapii anty-HBV. Rolę oznaczania HBsAg najlepiej poznano w przebiegu leczenia zakażeń HBV przy użyciu interferonu pegylowanego (PEG-IFN). W niniejszej pracy przedstawiono aktualną wiedzę na temat praktycznych aspektów pomiaru stężenia antygeny HBs.

Słowa kluczowe: stężenie antygeny HBs, wskaźnik aktywności zakażenia, nieinwazyjny marker aktywności ccc DNA

J. Transf. Med. 2016; 9: 6–9

Summary

Quantification of HBsAg is an important clinical marker of chronic hepatitis B activity. So far it is the only noninvasive indicator of cccDNA activity and severity of HBV infection of hepatocytes. A dynamic change of serum HBsAg levels, regardless of the type of administered therapy or in the natural course of chronic hepatitis B, might be predictive of HBsAg-loss which is the optimal end-point of HBV-infection. It is valid not only for current therapies but also for those in development. The most comprehensive knowledge of clinical application of HBsAg quantification has been gained during PEG-IFN therapy. This review focuses on the practical aspects of HBsAg quantification.

Key words: quantification of HBsAg, marker of chronic hepatitis B activity, noninvasive indicator of cccDNA activity

J. Transf. Med. 2016; 9: 6–9

Wstęp

Wirus zapalenia wątroby typu B (HBV, *hepatitis B virus*) jest najczęściej na świecie występującym wirusem hepatotropowym, który wywołuje przewlekłe zapalenie wątroby (PZW-B), a w konsekwencji może doprowadzić do marskości tego narządu oraz raka wątrobowokomórkowego (HCC, *hepatocellular carcinoma*). Liczbę osób zakażonych HBV na świecie szacuje się na ponad 300 milionów, w Polsce zaś liczba ta może sięgać 150–200 tysięcy. Ryzyko rozwoju marskości wątroby oblicza się na 15–20% u chorych z PZW-B, zaś HCC nawet do 2–3% rocznie [1]. Cechy unikalne tego wirusa to: jego zdolność do integracji z genomem gospodarza, tworzenia stabilnych form replikacyjnych w jądrach zakażonych komórek (cccDNA, *covalently closed circular DNA*), skuteczne tłumienie odpowiedzi immunologicznej ustroju (tzw. *stealth virus*) oraz bezpośrednie działanie onkogenne. Obecność cccDNA w jądrach zakażonych komórek, głównie hepatocytów, uniemożliwia eliminację zakażenia [2]. Po przebyciu infekcji pierwotnej cccDNA pozostaje w zainfekowanych komórkach przez wiele lat i może być przyczyną reaktywacji HBV u osób, które przed laty przebyły zakażenie HBV, obecnie zaś znajdują się w stanie immunosupresji (terapię przeciwciałami monoklonalnymi, choroby nowotworowe, układowe). Ważne jest, że cccDNA powstaje już w 24 godziny po zakażeniu HBV, zaś liczba cząsteczek tego minichromosomu utrzymuje się na poziomie zależnym od fazy zakażenia. Co więcej, cccDNA jest niewrażliwe na stosowane obecnie leczenie supresyjne HBV — inhibitory polimerazy DNA (tzw. analogi nukleozydowe i nukleotydydowe). Właśnie z cccDNA powstaje wirusowe DNA oraz białka, między innymi antygen powierzchniowy (HBsAg, *hepatitis B surface antigen*) oraz antygen rdzeniowy (HBcAg, *hepatitis B core antigen*). Istotne jest to, że stężenie tych antygenów w surowicy krwi i tkance wątrobowej może pośrednio odzwierciedlać liczbę kopii cccDNA oraz ich aktywność [3]. Wywołało to olbrzymie zainteresowanie pomiarem stężenia antygeny HBs oraz HBc w surowicy krwi jako wykładników aktywności choroby, a także odpowiedzi na leczenie przeciwwirusowe. Pomiar stężenia HBsAg jest szczególnie cennym biomarkerem, ponieważ właśnie utratę HBsAg uważa się za optymalny punkt docelowy leczenia, zatem jego dynamiczny pomiar ilościowy w czasie może wskazywać na prawdopodobieństwo serokonwersji w układzie HBsAg. Dopiero w ostatnich latach wprowadzono automatyczne systemy pomiaru stężenia HBsAg, w których stężenie HBsAg odnosi się do standardu

Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*), a więc wyrażone jest w jednostkach międzynarodowych (IU/ml). Ma to istotne znaczenie z punktu widzenia porównywalności wyników uzyskiwanych w różnych laboratoriach i przy użyciu różnych metod. W badaniach własnych przy użyciu platformy analitycznej Roche Elecsys oraz Abbott Architect średnia różnica pomiaru wynosiła zaledwie 5% [4].

Pomiar stężenia HBsAg w przebiegu naturalnym PZW-B

Przewlekłe zakażenie HBV jest chorobą dynamiczną, przebiegającą w 5 głównych fazach. Kluczowe z punktu widzenia praktyki klinicznej jest rozróżnienie faz aktywnego zapalenia wątroby (z dodatnim lub ujemnym HBeAg) od faz niewymagających leczenia: fazy niskiej replikacji (tzw. nosicielstwa HBsAg) oraz wysokiej replikacji z dodatnim HBeAg (tzw. fazy tolerancji immunologicznej) [5]. Użycie rutynowych metod diagnostycznych, takich jak ocena aktywności ALT (aminotransferaza alaninowa) oraz stężenia HBV-DNA (*hepatitis B virus deoxyribonucleic acid*), wymaga długotrwałej obserwacji chorych z uwagi na znaczne wahania tych parametrów w czasie (min. 12 miesięcy obserwacji). Z drugiej strony stwierdzono, że stężenie HBsAg w surowicy pozostaje na stabilnym poziomie, którego wartość zależy od fazy w przebiegu naturalnym PZW-B. W badaniach własnych, obejmujących ponad 200 chorych zakażonych HBV nieotrzymujących leczenia przeciwwirusowego, stwierdzono, że najwyższe stężenie HBsAg w surowicy występuje w aktywnych fazach PZW-B, zaś najniższe u chorych z chorobą nieaktywną (tzw. nosicieli HBsAg). W badaniu tym stężenie HBsAg u chorych z aktywnym PZW-B zwykle przekraczało 5000 IU/ml. Obserwacja ta może ułatwiać kwalifikację do leczenia przeciwwirusowego [6]. Co ważne, obserwacja długoterminowa tej kohorty wskazywała, że zakażeni HBV z niską replikacją, ale wysokim stężeniem HBsAg w dalszym przebiegu zakażenia częściej doświadczali reaktywacji zakażenia, co podkreśla znaczenie prognostyczne tego wskaźnika. Obserwacje te zostały potwierdzone w dalszych badaniach. W pracy Brunetto i wsp. [7] stwierdzono, że u chorych zakażonych genotypem D HBV jednokrotny pomiar HBV-DNA < 2000 IU/ml oraz HBsAg < 1000 IU/ml charakteryzuje się 91-procentową czułością i 95-procentową swoistością w różnicowaniu chorych z aktywnym i nieaktywnym zakażeniem. Należy jednak podkreślić, że genotyp HBV może mieć związek ze stężeniem

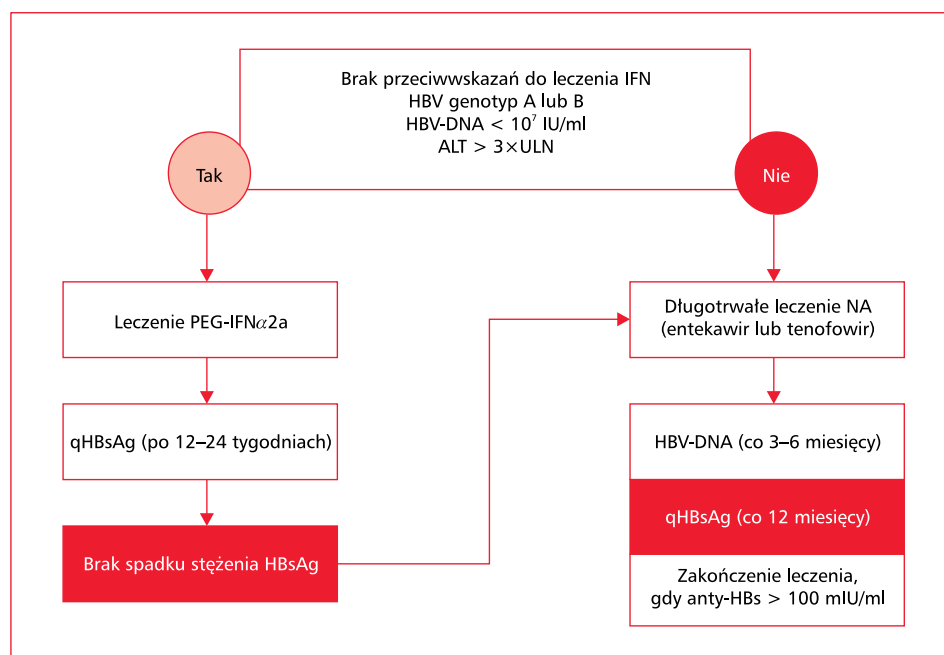
HBsAg, szczególnie HBV-A, tak więc prawidłowa ocena predykcji aktywności choroby na podstawie stężenia HBsAg wymaga uprzedniego przeprowadzenia genotypowania HBV.

Stężenie HBsAg w surowicy jako wskaźnik predycyjny odpowiedzi na leczenie PZW-B

Jak wspomiano wyżej, w praktyce zasadniczą wartością oznaczania HBsAg jest jego wartość rokownicza w przewidywaniu utraty HBsAg, co jest optymalnym punktem docelowym wszystkich terapii HBV. A zatem, niezależnie od rodzaju prowadzonej terapii dynamiczny spadek stężenia tego wskaźnika jest markerem korzystnym rokowniczo. Jest to prawdziwe w stosunku do aktualnych, ale też przyszłych terapii anti-HBV. Rolę oznaczania HBsAg poznano najlepiej w przebiegu leczenia zakażeń HBV przy użyciu interferonu pegylowanego (PEG-IFN). Jest to jedyny aktualnie stosowany wskaźnik, dzięki któremu można przewidywać skuteczność takiego leczenia już po 3 miesiącach, czyli na długo przed zakończeniem terapii zarówno u chorych z HBeAg, jak i bez HBeAg. W badaniach obejmujących ponad 800 chorych z dodatnim antygenem HBe stwierdzono, że brak spadku stężenia HBsAg o minimum 10% w stosunku do wartości wyjściowej po 12 tygodniach leczenia praktycznie

wyklucza uzyskanie trwałej odpowiedzi wirusologicznej (NPV na poziomie 98–100%) [8]. Jest to ważna klinicznie obserwacja, która znalazła odzwierciedlenie w polskich oraz europejskich wytycznych leczenia PZW-B. Ocena dynamiki stężenia HBsAg pozwala na indywidualizację leczenia oraz uniknięcie niepotrzebnej ekspozycji chorych na stosunkowo toksyczne działanie interferonu pegylowanego u chorych z HBeAg dodatnim i HBeAg ujemnym PZW-B [9]. Szczegółowe reguły skuteczności leczenia PEG-IFN są zawarte w wytycznych leczenia zakażeń HBV przygotowywanych przez Polską Grupę Ekspertów HBV [10]. Dotyczą one pomiaru stężenia antygeny HBs po 12 i 24 tygodniach od rozpoczęcia leczenia PEG-IFN α 2a. Należy podkreślić, że reguły skuteczności są zależne od genotypu HBV, co dodatkowo podkreśla znaczenie genotypowania tego wirusa. Uproszczony schemat indywidualizacji leczenia PZW-B oparty na pomiarze stężenia HBsAg przedstawiono na rycinie 1.

Ważną cechą ilościowego pomiaru HBsAg jest niezależność jego stężenia od aktywności polimerazy HBV. Ma to szczególne znaczenie w trakcie leczenia inhibitorami polimerazy HBV (tzw. analogami nukleoz(t)ydowymi), które są grupą leków najczęściej stosowaną w przebiegu leczenia PZW-B. Leki te wykazują korzystny profil bezpieczeństwa, a u znacznej większości chorych powodują zanik HBV-DNA w surowicy krwi, zatem



Rycina 1. Proponowany algorytm terapeutyczny przewlekłego zapalenia wątroby typu B z uwzględnieniem pomiaru stężenia antygeny HBs (zmodyfikowano na podstawie [5])

Figure 1. Suggested algorithm of chronic hepatitis B therapy based on HBsAg quantification (modified from [5])

zmniejszając ryzyko rozwoju marskości wątroby, a nawet HCC. Istotne jest to, że oznaczanie stężenia HBsAg możliwe jest nawet przy niewykrywalnym HBV-DNA. Ponadto, tak jak w przypadku chorych nieleczonych, tak samo w trakcie leczenia inhibitorami polimerazy HBV stężenie HBsAg odzwierciedla aktywność cccDNA oraz liczbę zakażonych hepatocytów. U większości chorych stężenie HBsAg w trakcie leczenia tymi preparatami pozostaje niezmiennione, co wynika z ich braku aktywności wobec cccDNA. Jednakże, u pewnej części osób dochodzi do spadku stężenia tego wskaźnika, co jest korzystnym rokowniczo markerem wskazującym na możliwość utraty HBsAg. W badaniach własnych stwierdzono, że spadek stężenia HBsAg w trakcie leczenia analogami nukleoz(t)ydowymi dotyczył 19% chorych w okresie obserwacji do 7 lat leczenia [11]. Co ważne, utratę HBsAg, a więc najbardziej optymalny punkt docelowy terapii, obserwowano tylko u chorych, u których stężenie HBsAg uległo obniżeniu o minimum 10% w ciągu 2 lat od negatywizacji HBV-DNA. Fakt ten można wykorzystywać w motywacji chorego do dalszego leczenia anty-HBV.

Wśród najnowszych koncepcji terapeutycznych pojawiają się możliwości leczenia skojarzonego, czy też sekwencyjnego przy zastosowaniu inhibitorów polimerazy HBV oraz PEG-IFN α [12]. Tutaj też oznaczanie HBsAg jest najlepszym wskaźnikiem odpowiedzi na leczenie, ale może także wyznaczać optymalną chronologię terapii. Przykładowo stwierdzono, że dodanie PEG-IFN jest najskuteczniejsze u chorych, u których w trakcie wieloletniej terapii inhibitorami polimerazy HBV doszło do znacznego obniżenia stężenia HBsAg. W badaniu OSST przy użyciu terapii sekwencyjnej (entekawir, a następnie PEG-IFN α 2a) uzyskano utratę HBsAg nawet u 39% leczonych w rok po zakończeniu terapii [13].

Podsumowując, oznaczanie stężenia HBsAg jest przydatnym klinicznie i uniwersalnym wskaźnikiem aktywności zakażenia HBV. Niezależnie od tego, czy chory otrzymuje terapię anty-HBV, czy jest nieleczony, pomiar stężenia antygeny HBs jest jedynym nieinwazyjnym wskaźnikiem aktywności cccDNA oraz liczby zakażonych hepatocytów. Jego trwały spadek wskazuje na dużą szansę utraty HBsAg, co wiąże się z dobrym rokowaniem w PZW-B.

Pewne aspekty pomiaru stężenia HBsAg wymagają dalszego doprecyzowania, w szczególności w zakresie jego zależności od genotypu HBV. Ma duże znaczenie dla populacji Polski, gdzie przeważa genotyp A HBV.

Konflikt interesów

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

Piśmiennictwo

1. Villa E., Fattovich G., Mauro A., Pasino M. Natural history of chronic HBV infection: special emphasis on the prognostic implications of the inactive carrier state versus chronic hepatitis. *Dig. Liver Dis.* 2011; 43: 8–14.
2. Levrero M., Pollicino T., Petersen J., Belloni L., Raimondo G., Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2009; 51: 581–592.
3. Chan H.L., Thompson A., Martinot-Peignoux M. i wsp. Hepatitis B surface antigen quantification: why and how to use it in 2011 — a core group report. *J. Hepatol.* 2011; 55: 1121–1131.
4. Wursthorn K., Jaroszewicz J., Zacher B.J. i wsp. Correlation between the Elecsys HBsAg II assay and the Architect assay for the quantification of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in the serum. *J. Clin. Virol.* 2011; 50: 292–296.
5. Cornberg M., Jaroszewicz J., Manns M.P., Wedemeyer H. Treatment of chronic hepatitis B. *Minerva Gastroenterol. Dietol.* 2010; 56: 451–465.
6. Jaroszewicz J., Calle Serrano B., Wursthorn K. i wsp. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels in the natural history of hepatitis B virus (HBV) infection: a European perspective. *J. Hepatol.* 2010; 52: 514–522.
7. Brunetto M.R., Oliveri F., Colombatto P. i wsp. Hepatitis B surface antigen serum levels help to distinguish active from inactive hepatitis B virus genotype D carriers. *Gastroenterology* 2010; 139: 483–490.
8. Sonneveld M.J., Hansen B.E., Piratvisuth T. i wsp. Response-guided peginterferon therapy in hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B using serum hepatitis B surface antigen levels. *Hepatology* 2013; 58: 872–880.
9. European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2012; 57: 167–185.
10. Juszczyk J., Boron-Kaczmarek A., Cianciara J. i wsp. Zalecenia terapeutyczne na rok 2013: Leczenie przeciwwirusowe przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu B. *Przegl. Epidemiol.* 2013; 67: 383–391.
11. Jaroszewicz J., Ho H., Markova A. i wsp. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) decrease and serum interferon-inducible protein-10 levels as predictive markers for HBsAg loss during treatment with nucleoside/nucleotide analogues. *Antivir. Ther.* 2011; 16: 915–924.
12. Marcellin P., Ahn S.H., Ma X. i wsp. Combination of Tenofovir Disoproxil Fumarate and Peginterferon α -2a Increases Loss of Hepatitis B Surface Antigen in Patients With Chronic Hepatitis B. *Gastroenterology* 2016; 150: 134–144.
13. Han M., Jiang J., Hou J. i wsp. Sustained immune control in HBeAg-positive patients who switched from entecavir therapy to pegylated interferon- α 2a: 1-year follow-up of the OSST study. *Antivir. Ther.* 2016; doi: 10.3851/IMP3019.