

# Praktyczne zastosowanie ilościowego oznaczania stężeń antygeny HBs

## Practical aspects of HBs antigen quantification

**Jerzy Jaroszewicz**

Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Białystok, Polska

**Summary:** The monitoring of chronic hepatitis B treatment efficacy is often difficult in clinical practice. In majority of patients receiving long-term therapy with nucleos(t)ides analogues (NA) HBV viral load is fully suppressed. Furthermore, the dynamics of HBV-DNA during first weeks of therapy with interferons (IFN) is similar in patients with sustained viral response and in relapsers.

A significant breakthrough in predicting the response to anti-HBV has been made in last years. The development of standardized assays for HBs antigen quantification (qHBsAg) in a serum has shed new light on this old marker. HBsAg is secreted from infected hepatocytes in form of infectious virions but also defective particles. Therefore, measurement of its concentration yields additional information on the extensiveness of HBV infection in the liver. Current evidence shows a strong predictive value of HBsAg decline during first weeks of PEG-IFN in HBeAg(+) and HBeAg(-) hepatitis for therapy outcomes. Moreover, own data suggest that in low-replicative HBsAg carriers HBsAg levels are very low, suggesting an association between qHBsAg and immune control of HBV. Preliminary studies also show that the dynamics of serum HBsAg levels during NA therapy may predict HBsAg-loss in the follow-up. Interestingly, HBsAg drop seems to reflect an activation of endogenous interferon system.

In summary, preliminary data suggest potential usefulness of HBsAg quantification in monitoring of response to the therapy in chronic hepatitis B patients as well as during natural course of HBV-infection. Further data obtained in controlled, prospective trials is mandatory before application of qHBsAg in routine, clinical practice.

**Słowa kluczowe:** HBV • antygen HBs • interferon • leczenie przeciwwirusowe • indywidualizacja leczenia

**Key words:** HBV • HBs antigen • interferon • antiviral therapy • therapy individualization

**Adres do korespondencji:** Jerzy Jaroszewicz, Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, ul. Żurawia 14, 15-540 Białystok, Polska, e-mail: jerzy.jaroszewicz@umwb.edu.pl

### Wstęp

Najistotniejszą z punktu widzenia klinicznego cechą wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV) jest zdolność do wywoływania zakażeń przewlekłych, nawet u osób z prawidłową funkcją układu odpornościowego. W przebiegu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu B (PZW-B) HBV wytwarza stabilne formy replikacyjne w zakażonych hepatocytach (episomalna postać HBV – cccDNA). W późniejszych fazach zakażenia może także dochodzić do integracji wirusowego DNA z genomem gospodarza. Powoduje to, że zakażenia HBV są szczególnie trudne w leczeniu, możliwość kompletnej eradykacji HBV jest poddawana w wątpliwość, zaś przypadki rozwoju pierwotnego raka wątroby częste [1,2].

Współczesna medycyna dysponuje skutecznymi lekami hamującymi replikację HBV. Długotrwałe leczenie analogami nukleoz(t)ydowymi (AN) wiąże się z kompletną supresją HBV-DNA w rok po jego rozpoczęciu u 70–90% chorych [3]. Z drugiej strony po przerwaniu leczenia często dochodzi do reaktywacji HBV. Wynika to w dużej mierze z niewielkiego wpływu AN na zawartość cccDNA w zakażonych hepatocytach. U chorych z dodatnim antygenem HBe (HBeAg) w 48 miesięcy po zaprzestaniu leczenia z powodu serokonwersji w układzie HBeAg odsetek chorych z nawrotem choroby sięgał ponad 40% [4]. W zapaleniu wątroby z ujemnym antygenem HBe sytuacja jest jeszcze bardziej skomplikowana. Brak jest jednoznacznie określonych zasad dotyczących zakończenia leczenia. Przyjmuje się obecnie, że terapia powinna

trwać latami, a u części chorych nawet dożywotnio. Optymalnym punktem końcowym leczenia wiążącym się z trwałą remisją zakażenia HBV i korzystnym rokowaniem jest serokonwersja w układzie HBsAg [1,5]. Z drugiej strony, najnowsze doniesienia wskazują, że szacowany czas leczenia AN do momentu uzyskania serokonwersji w układzie HBs u około 40% pacjentów będzie wynosił ponad 30 lat, podczas gdy jedynie u 10% będzie krótszy niż 10 lat [6]. Tym bardziej istnieje potrzeba wyselekcjonowania wskaźników mogących przewidywać skuteczność leczenia, a także pozwalających na jego indywidualizację.

Obecnie jednym z istotniejszych kandydatów na biomarker oceniający postęp leczenia anty-HBV jest ilościowy pomiar stężenia antygenu HBs (qHBsAg). HBsAg był pierwszym odkrytym białkiem HBV [7] i do dnia dzisiejszego pozostaje fundamentalnym wskaźnikiem diagnostycznym zakażenia HBV. Występuje w surowicy w kilku formach: kompletnych wirionów HBV (cząstki Dane'a, 42 nm), różnej długości filamentów, jak również cząstek sferycznych (20–22 nm) odpowiadającym niekompletnym wirionom [8]. Co ważne, synteza i wydzielanie HBsAg nie pozostaje w ścisłym związku z replikacją HBV, zaś ilość niekompletnych cząstek wirusa w surowicy znacznie przekracza ( $10^2$ – $10^5$ ) liczbę zakaźnych wirionów [8]. Czyni to qHBsAg cennym wskaźnikiem aktywności choroby, szczególnie u chorych z niewykrywalnym HBV-DNA.

### Znaczenie ilościowego pomiaru HBsAg w przebiegu naturalnym zakażenia HBV

Pierwsze badania obejmujące pomiar stężenia HBsAg w surowicy prowadzono już przed ponad 20 laty [9], jednakże dopiero ostatnie lata przyniosły znaczący postęp w tym zakresie. Wprowadzono zautomatyzowane zestawy chemiluminescencyjne pozwalające na pomiar stężenia HBsAg z dużą powtarzalnością, o stosunkowo niewielkim koszcie, a co ważniejsze w oparciu o międzynarodowe standardy HBsAg (IU/mL), tak więc umożliwiające porównywanie wyników uzyskanych w różnych laboratoriach [10,11].

Badania dotyczące zakażonych HBV nie otrzymujących leczenia przeciwwirusowego pozwoliły na zgłębienie procesów regulujących syntezę HBsAg, jak również jego korelację z wewnątrzwartościową zawartością białek HBV. W pracy własnej [12] obejmującej 224 chorych z PZW-B przeanalizowano związek pomiędzy fazą zakażenia oraz genotypem HBV a stężeniem HBsAg. Najwyższe stężenia HBsAg odnotowano u chorych na wczesnych etapach zakażenia z dodatnim antygenem HBe (faza tolerancji immunologicznej oraz immuno-eliminacji). Z drugiej strony najniższe wartości zaobserwowano u nosicieli antygenu HBs, tak więc u osób ze skuteczną kontrolą immunologiczną HBV. Badania te sugerują powiązanie stężenia HBsAg z siłą swoistej odpowiedzi przeciwwirusowej. Co ciekawe, również korelacja pomiędzy ilością HBsAg a HBV-DNA zależała od fazy zakażenia. Podczas gdy dynamika HBsAg i HBV-DNA jest ściśle powiązana w ostrym WZW-B, w zakażeniach przewlekłych dochodzi do rozregulowania tej zależności. Potwierdzeniem tych wyników są badania nad zawartością wirusowego DNA wewnątrz zakażonych hepatocytów. Podczas gdy stężenie HBsAg silnie dodatnio koreluje z ilością cccDNA i całkowitego HBV-DNA w wątrobie u chorych z dodatnim antygenem HBe, u chorych z późniejszych fazach zakażenia nie obserwuje się już takiej zależności. Natomiast poziom HBsAg w dużej mierze zależy

od obecności mutacji w regionie pre-core [13]. Podsumowując, stężenie HBsAg w surowicy wydaje się w dużo większym stopniu odzwierciedlać zawartość transkrypcyjnie aktywne-go cccDNA niż stopień replikacji HBV. qHBsAg może więc służyć do nieinwazyjnej oceny zawartości wirusowego DNA bezpośrednio w wątrobie [14].

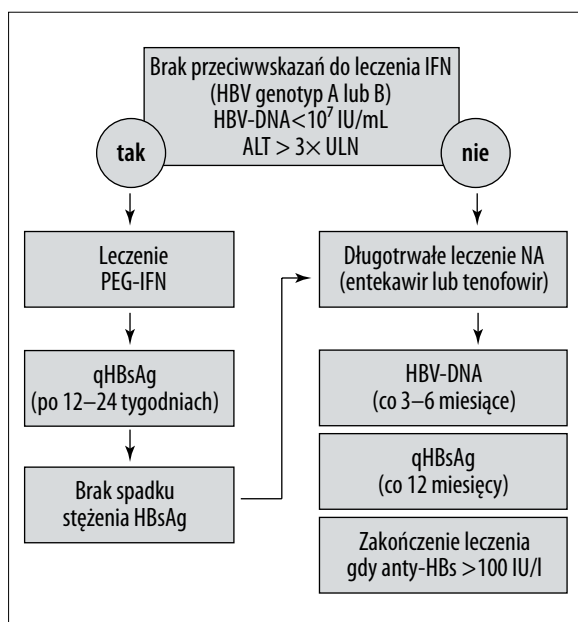
Wyżej opisane zależności umożliwiają zastosowanie ilościowego pomiaru HBsAg w ocenie aktywności choroby u nosicieli antygenu HBsAg. W cytowanych wyżej badaniach własnych [12] u nosicieli antygenu HBs, u których doszło do nawrotu replikacji HBV-DNA stwierdzono istotnie statystycznie wyższe stężenie HBsAg ( $>3,500$  IU/mL). Obserwacja ta została potwierdzona w badaniu obserwacyjnym Brunetto i wsp. [15]. Stężenie antygenu HBs  $<1,000$  IU/mL w połączeniu z HBV-DNA  $<2,000$  IU/mL było w stanie zidentyfikować pacjentów ze stabilnie i długoterminowo niską replikacją HBV z czułością 91% i swoistością 95%. Co ważniejsze, tylko w tej grupie chorych zanotowano przypadki spontanicznej serokonwersji w układzie HBsAg (10 z 56 chorych). Co prawda przydatność oznaczania HBsAg u chorych nie otrzymujących leczenia anty-HBV wymaga dalszego potwierdzenia, jednakże już dostępne dane wskazują, że może ono być jednym z wiodących wskaźników w rutynowym monitorowaniu nosicieli antygenu HBs.

### Stężenie antygenu HBs w trakcie leczenia interferonem

Praktyczne znaczenie oznaczania stężenia HBsAg w PZW-B zostało najlepiej scharakteryzowane u chorych leczonych interferonem pegylovanym alfa2a (PEG-IFN alfa2a). W jednym z pierwszych badań obejmujących 386 pacjentów z HBeAg(-) PZW-B, Brunetto i wsp. [16] odnotowali obniżanie się stężenia HBsAg u chorych leczonych PEG-IFN alfa2a, podczas gdy poziom tego wskaźnika ulegał jedynie niewielkim zmianom w grupie chorych otrzymujących lamiwudynę (LAM). Co ważniejsze, spadek stężenia HBsAg przekraczający  $1 \log_{10}$  IU/mL w trakcie leczenia był silnie związany z utratą antygenu HBs w trzy lata po jego zakończeniu. Obserwacja ta została potwierdzona przez Mourcari i wsp. [17], którzy stwierdzili, że obniżenie stężenia HBsAg o  $0,5 \log_{10}$  IU/mL w 12 tygodniu oraz o  $1 \log_{10}$  IU/mL w 24 tygodniu leczenia PEG-IFN alfa2a u chorych z ujemnym antygenem HBe, wiązała się z dodatnią wartością predykcyjną dla trwałej odpowiedzi wirusologicznej rzędu 89% i 92%. Warto podkreślić, że u pacjentów u których nie uzyskano supresji HBV-DNA po leczeniu (*non-responders*), a także u tych z nawrotem replikacji (*relapsers*) stężenie antygenu HBs w trakcie leczenia nie uległo istotnemu obniżeniu. Stwarza to możliwości przewidywania odpowiedzi na leczenie już na jego wczesnych etapach, m.in. w 12 tygodniu.

Również kolejne prace potwierdziły zależność pomiędzy dynamiką HBsAg a odpowiedzią na leczenie PEG-IFN w PZW-B, skupiając się głównie na jego ujemnej wartości predykcyjnej. Sonneveld i wsp. [18] opierając się na analizie stężenia HBsAg u chorych z dodatnim HBe w trakcie leczenia PEG-IFN alfa2b, stwierdzili, że brak spadku HBsAg w 12 tygodniu leczenia w 97% wykluczał odpowiedź na leczenie. Jedynie u dwóch z 202 chorych, u których nie doszło do obniżenia poziomu antygenu HBs zaobserwowano utratę HBeAg. Podobną zależność zaobserwowano również w HBeAg ujemnym PZW-B. W niedawno opublikowanej pracy Rijckborst i wsp. [19] stwierdzili, że połączone oznaczenie stężenia





**Rycina 1.** Proponowany schemat zastosowania oznaczania stężenia antygeny HBs w indywidualizacji leczenia przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu B. Na podstawie Cornberg i wsp. [3].

HBsAg oraz HBV-DNA w 12 tygodniu leczenia PEG-IFN alfa2a pozwoliło na pewną identyfikację osób, które nie uzyskały trwałej supresji replikacji po jego zakończeniu. U dwudziestu ze 102 pacjentów włączonych do badania nie zaobserwowano spadku stężenia antygeny HBsAg, a także obniżenia się HBV-DNA o ponad 2  $\log_{10}$  IU/ML. Zarazem żaden z tych chorych nie uzyskał SVR. Podsumowując dotychczasowe dane wskazują na wysoką wartość predykcyjną oceny dynamiki HBsAg w czasie interferonoterapii.

Warto podkreślić, że leczenie interferonem PZW-B cechuje się trwałą odpowiedzią przeciwwirusową, jednakże dotycząca stosunkowo niewielkiego odsetka chorych [20]. Serokonwersja HBe występuje u ok 30% chorych w 6 m-cy po zakończeniu leczenia [21]. Tak więc wysoka ujemna wartość predykcyjna oznaczania HBsAg stwarza interesujące i przydatne klinicznie możliwości. U chorych, u których nie obserwuje się spadku stężenia HBsAg w 12 tygodniu interferonoterapii, można rozważyć zaprzestanie podawania interferonu i zastosowanie jednego z analogów nukleoz(t)ydowych, a być może również terapii skojarzonych. Koncepcja ta choć atrakcyjna, wymaga dalszego potwierdzenia w badaniach klinicznych. Jeden z możliwych algorytmów indywidualizacji leczenia opartego na qHBsAg [3] przedstawiono na Rycinie 1.

### Oznaczanie stężenia HBsAg w trakcie leczenia analogami nukleoz(t)ydowymi

Stosunkowo niewiele jest danych dotyczących przydatności oznaczania stężenia antygeny HBs w trakcie leczenia analogami nukleoz(t)ydowymi (AN). Większość dostępnych publikacji wskazuje na niewielką dynamikę tego markera podczas terapii AN [16,21]. Z drugiej strony część doniesień wskazuje, że terapia skojarzona PEG-IFN oraz lamiwudyną wywołuje redukcję stężenia HBsAg większego stopnia w porównaniu do monoterapii interferonem [18]. U niektórych chorych tuż po rozpoczęciu leczenia silnie działającymi AN (m.in. tenofowirem) dochodzi do znacznej redukcji

poziomu HBsAg, a w dalszej konsekwencji do utraty antygeny HBs [22]. Wursthorn i wsp. [23] przeanalizowali w ramach prospektywnego badania Globe dynamikę stężenia HBsAg u chorych z HBeAg(+) PZW-B leczonych telbivudyną. Utratę antygeny HBs odnotowano u 9 z 162 badanych. W grupie tej odnotowano wyższe wyjściowe stężenie HBsAg, a także znacznie szybszą dynamikę HBsAg w pierwszym roku leczenia przeciwwirusowego. Podobnie jak w przypadku leczenia interferonem, u żadnego z pacjentów u których nie doszło do obniżenia stężenia HBsAg w pierwszym roku leczenia nie odnotowano przypadków utraty HBsAg.

W celu potwierdzenia potencjalnej przydatności pomiaru HBsAg w rutynowej praktyce klinicznej przeprowadzono retrospektywną ocenę jego stężeń u 95 chorych z różnymi genotypami HBV, a także leczonych przy użyciu różnorodnych AN [24]. W okresie obserwacji (max. 107 miesięcy) odnotowano 5 przypadków utraty antygeny HBs. Podobnie jak w wyżej cytowanej pracy [24], również w badaniu własnym pacjenci ci charakteryzowali się wyższym wyjściowym stężeniem antygeny HBs, lecz także wyższą aktywnością ALT. Co ciekawe, wszyscy chorzy u których doszło do utraty antygeny HBsAg wykazywali szybki profil spadku stężenia HBsAg ( $>0,5 \log_{10}$  IU/mL) w okresie dwóch lat od negatywizacji HBV-DNA. Obserwacja ta jest o tyle ważna z klinicznego punktu widzenia, że w chwili obecnej nie opisano innych markerów predykcyjnych u chorych z pełną supresją replikacji HBV w trakcie długotrwałego leczenia AN. Wyżej opisywany szybki profil obniżania się stężenia antygeny HBs zanotowano u 19% badanych. Co więcej, w tej grupie odnotowano również istotnie wyższe stężenia cytokiny IP-10 w surowicy, która odzwierciedla aktywację i produkcję endogennego interferonu. Wydaje się więc, że dynamika antygeny HBs w trakcie leczenia AN jest powiązana ze skuteczną kontrolą immunologiczną replikacji HBV. Zważywszy na fakt, że aktualnie nie ma jednoznacznych kryteriów zakończenia terapii analogami nukleoz(t)ydowymi, szczególnie u chorych HBeAg(–) oznaczanie stężenia HBsAg może pełnić istotną funkcję oceny skuteczności, a także być może kryterium pozwalającym na zakończenie terapii. Z drugiej strony u chorych, u których nie dochodzi do spadku stężenia antygeny HBs w czasie kilkuletniego leczenia AN, można będzie w przyszłości rozważyć zastosowanie interferonoterapii, jako leczenia immunomodulacyjnego.

### Wnioski

Pomiar stężenia antygeny HBsAg charakteryzuje się wszystkimi cechami biomarkera, m.in. automatyzacją oznaczania, standaryzacją, niewielkim kosztem, a także krótkim czasem oznaczania. Ponadto dostępne dane sugerują, że pomiar jego stężenia może być istotnym elementem w monitorowaniu aktywności choroby u chorych nie otrzymujących leczenia anty-HBV. qHBsAg może też być ważnym elementem oceny skuteczności, a nawet indywidualizacji leczenia przeciwwirusowego. Istnieje jednak wiele kwestii wymagających dalszej wnikliwej analizy przed wprowadzeniem qHBsAg do rutynowej praktyki klinicznej. Dotyczą one przede wszystkim przydatności oznaczania HBsAg u chorych z różnymi genotypami HBV, a także potencjalnym wpływem mutacji HBV na stężenie HBV. W celu ostatecznego potwierdzenia przydatności qHBsAg niezbędne wydaje się przeprowadzenie szeroko zakrojonych prospektywnych badań klinicznych obejmujących chorych zakażonych HBV mieszkających w różnych regionach geograficznych oraz na różnorodnych etapach zakażenia HBV.

1. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. *J Hepatol*, 2009; 50: 227–42
2. Juszczyk J, Boroń-Kaczmarek A, Cianciara J i wsp.: Polska Grupa Ekspertów HBV. Zalecenia terapeutyczne na rok 2010: Leczenie przeciwwirusowe przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu B. *Przegl Epidemiol*, 2010; 64: 81–82
3. Cornberg M, Jaroszewicz J, Manns MP, Wedemeyer H: Treatment of chronic hepatitis B. *Minerva Gastroenterol Dietol*, 2010; 56: 451–65
4. Reijnders JG, Perquin MJ, Zhang N i wsp.: Nucleos(t)ide analogues only induce temporary hepatitis B e antigen seroconversion in most patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 2010; 139: 491–98
5. Fattovich G, Giustina G, Sanchez-Tapias J i wsp.: Delayed clearance of serum HBsAg in compensated cirrhosis B: relation to interferon alpha therapy and disease prognosis. *European Concerted Action on Viral Hepatitis (EUROHEP)*. *Am J Gastroenterol*, 1998; 93: 896–900
6. Cheveliez S, Hezode C, Grare C, Pawlotzky J: Long-term monitoring of HBsAg kinetics and prediction of hbsag clearance in patients with chronic hepatitis B treated with nucleoside/nucleotide analogues. *Hepatology*, 2010; 52(S1): 506A
7. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S: A “New” antigen in leukemia sera. *JAMA*, 1965; 191: 541–46
8. Seeger C, Mason WS: Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000; 51–68
9. Whitehead TP, Thorpe GHG, Carter TJN i wsp.: Enhanced luminescence procedure for sensitive determination of peroxidase-labelled conjugates in immunoassay. *Nature*, 1983; 305: 158–59
10. Deguchi M, Yamashita N, Kagita M i wsp.: Quantitation of hepatitis B surface antigen by an automated chemiluminescent microparticle immunoassay. *J Virol Methods*, 2004; 115: 217–22
11. Wursthorn K, Jaroszewicz J, Zacher BJ 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: 292–96
12. 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: 514–22
13. Thompson AJ, Nguyen T, Iser D i wsp.: Serum hepatitis B surface antigen and hepatitis B e antigen titers: disease phase influences correlation with viral load and intrahepatic hepatitis B virus markers. *Hepatology*, 2010; 51: 1933–44
14. Brunetto MR: A new role for an old marker, HBsAg. *J Hepatol*, 2010; 52: 475–77
15. Brunetto MR, 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: 483–90
16. Brunetto MR, Moriconi F, Bonino F i wsp.: Hepatitis B virus surface antigen levels: a guide to sustained response to peginterferon alfa-2a in HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Hepatology*, 2009; 49: 1141–50
17. Moucari R, Mackiewicz V, Lada O i wsp.: Early serum HBsAg drop: a strong predictor of sustained virological response to pegylated interferon alfa-2a in HBeAg-negative patients. *Hepatology*, 2009; 49: 1151–57
18. Sonneveld MJ, Rijckborst V, Boucher CA i wsp.: Prediction of sustained response to peginterferon alfa-2b for hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B using on-treatment hepatitis B surface antigen decline. *Hepatology*, 2010; 52: 1251–57
19. Rijckborst V, Hansen BE, Cakaloglu Y i wsp.: Early on-treatment prediction of response to peginterferon alfa-2a for HBeAg-negative chronic hepatitis B using HBsAg and HBV DNA levels. *Hepatology*, 2010; 52: 454–61
20. van Nunen AB, Hansen BE, Suh DJ i wsp.: Durability of HBeAg seroconversion following antiviral therapy for chronic hepatitis B: relation to type of therapy and pretreatment serum hepatitis B virus DNA and alanine aminotransferase. *Gut*, 2003; 52: 420–24
21. Reijnders JG, Rijckborst V, Sonneveld MJ i wsp.: Kinetics of hepatitis B surface antigen differ between treatment with peginterferon and entecavir. *J Hepatol*, 2011; 54: 449–54
22. Marcellin P, Heathcote E, Buti M i wsp.: HbsAg kinetics in patients with chronic hepatitis B (CHB) treated with tenofovir disoproxil fumarate (TDF) for up to 4 years. *J Hepatol*, 2010; 54(S1): S297
23. Wursthorn K, Jung M, Riva A i wsp.: Kinetics of hepatitis B surface antigen decline during 3 years of telbivudine treatment in hepatitis B e antigen-positive patients. *Hepatology*, 2010; 52: 1611–20
24. Jaroszewicz J, Ho H, Deterding K i wsp.: Prediction of HBsAg loss by quantitative HBsAg kinetics during long-term treatment with nucleos(t)ide analogues. *Hepatology*, 2010; 52(S1): 516A

