

*Hanna Gregorek**, *Katarzyna Dzierżanowska-Fangrat**, *Marek Woynarowski***,
*Paulina Józwiak**, *Ewa Witkowska-Vogt **, *Urszula Wojda**,
*Małgorzata Syczewska****, *Jerzy Socha***, *Kazimierz Madaliński**

PRZETRWANIE HBV DNA U DZIECI LECZONYCH INTERFERONEM ALFA MIMO SEROKONWERSJI DO PRZECIWCIAŁ ANTY-HBS*

* Zakład Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej,
Instytut-Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie
Kierownik Zakładu: Danuta Dzierżanowska

** Klinika Gastroenterologii, Hepatologii i Immunologii

*** Klinika Rehabilitacji, Instytut Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie
Zakład Immunopatologii, Państwowy Zakład Higieny, Warszawa
Kierownik: Kazimierz Madaliński

Słowa kluczowe: przewlekłe wzv B, dzieci, leczenie IFN- α , serokonwersja, HBV-DNA
Key words: chronic hepatitis B, children, IFN- α treatment, seroconversion, HBV-DNA

Głównym celem naszych badań była próba odpowiedzi na następujące pytania: (1) czy w grupie dzieci z przewlekłym aktywnym wirusowym zapaleniem wątroby typu B, które odpowiedziały na leczenie IFN- α eliminacją z surowicy HBsAg i HBeAg oraz obecnością przeciwciał anti-HBs, serokonwersja utrzymuje się po upływie kilku lat od zakończenia leczenia; (2) czy i u jakiego odsetka dzieci uznanych za wyleczone na podstawie kryteriów obowiązujących w okresie prowadzonej terapii (HBsAg-/HBeAg-/anty-HBs+) obecny jest w surowicy HBV DNA, świadczący o przetrwaniu wirusa.

WSTĘP

Przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu B (p. wzv B) nadal stanowi w Polsce istotny problem kliniczny, między innymi, ze względu na brak skutecznego leczenia. Progresa wzv B w kierunku choroby przewlekłej zależy od wielu czynników, jednakże do najważniejszych z nich należą: niedojrzałość lub niedobory układu odporności oraz młody wiek w momencie zakażenia. W licznych doniesieniach wykazano, że zakażenie w okresie okołoporodowym w ok. 90% przechodzi w przewlekłe wzv B. Natomiast, gdy dochodzi

* Praca została wykonana w ramach grantu Komitetu Badań Naukowych Nr 6PO5 E 152-21.

do niego w okresie pierwszych 5 lat życia, w formę przewlekłą przechodzi ok. 20-30% przypadków (1). Dzieci zakażone wzw B uważa się za główne źródło rozprzestrzeniania infekcji na obszarach endemicznych.

Zakażenie może nastąpić w każdym wieku, a jego odległą konsekwencją jest możliwość wystąpienia groźnych chorób, takich jak przewlekłe zapalenie wątroby, marskość, a nawet pierwotny rak wątroby (2). Zahamowanie replikacji wirusa i stymulacja silnej odpowiedzi odpornościowej gospodarza mogą zapobiec postępowi choroby i ograniczyć jej następstwa. Dlatego opracowanie skutecznego leczenia przewlekłego wzw B stanowi priorytetowe zadanie dla wielu grup badawczych, zajmujących się tym problemem.

Interferon-alfa (IFN- α), naturalnie występująca cytokina, wykazująca zarówno działanie przeciwwirusowe jak i immunomodulacyjne, została zaproponowana do leczenia przewlekłego wzw B ok. 24 lata temu (3). Chociaż wykorzystanie rekombinantowych preparatów IFN- α (rIFN- α) jako leku przeciwwirusowego znacznie wzrosło w ostatnich latach, to jednak skuteczność jego działania jest wciąż niezadowalająca, a całkowita serokonwersja do przeciwciał anti-HBs jest rzadko obserwowana.

Wiadomo, że obok odporności typu komórkowego, odpowiedź typu humoralnego, a zwłaszcza synteza przeciwciał skierowanych przeciwko antygenowi powierzchniowemu (anti-HBs), odgrywa istotną rolę w eliminacji wolnych cząsteczek wirusa z krążenia i ogranicza jego rozprzestrzenianie się w ustroju (4). Zanik HBsAg, pojawienie się przeciwciał anti-HBs oraz normalizacja biochemicznych wskaźników funkcji wątroby są powszechnie stosowanym kryterium, świadczącym o skutecznej eliminacji zakażenia. Miano całkowitych anti-HBs przyjęto jako wskaźnik efektywności swoistej odpowiedzi odpornościowej na antygen powierzchniowy wirusa (HBsAg).

Efektywność swoistej odpowiedzi na wirusowe antygeny białkowe wymaga obecności przeciwciał neutralizujących, należących do izotypu IgG (5). Niemniej, liczne badania prowadzone na modelach zwierzęcych i u ludzi wykazały, że selekcja właściwej podklasy IgG [1-4] w odpowiedzi na dany patogen ma istotne znaczenie dla całkowitej eradykacji zakażenia. W naszych wcześniejszych badaniach oceny skuteczności działania terapeutycznego rIFN- α porównaliśmy profil przeciwciał anti-HBs w podklasach IgG po naturalnej (ostre wzw B) i indukowanej interferonem-alfa serokonwersji (przewlekłe wzw B). Wykazaliśmy, że po naturalnej serokonwersji synteza anti-HBs jest bardzo selektywna i ogranicza się prawie wyłącznie do IgG1 i IgG3, z minimalnym udziałem IgG2 i IgG4. Natomiast w grupie leczonej rIFN- α profil swoistych podklas IgG był bardzo zróżnicowany. Nieoczekiwanie, podklasa IgG4, która nie odgrywa istotnej roli w neutralizacji wirusów, a wręcz przeciwnie, może blokować dostęp do domen antygenowych przeciwciałom cytofilnym, była drugim, po IgG1, dominującym izotypem w odpowiedzi na HBsAg (6, 7). W ostatnich latach, dzięki wprowadzeniu nowoczesnych technik biologii molekularnej pozwalających na wykrywanie niewielkich ilości materiału genetycznego, u niektórych chorych po przebytych wzw B wykazano obecność HBV DNA w surowicy, wątrobie i/lub obwodowych komórkach jednojądrowych, mimo eliminacji HBeAg/HBsAg z krążenia i obecności anti-HBs (8, 9). Znaczenie kliniczne i przyczyny równoczesnej obecności anti-HBs i HBV DNA nie zostały całkowicie wyjaśnione, chociaż stan taki budzi zrozumiąły niepokój wśród badaczy i klinicystów. *Kato* i wsp. (10) obserwowali wzrost aktywności ALT po pojawieniu się przeciwciał anti-HBs u chorego z obecnym w surowicy HBV DNA. Trzy lata później stwierdzono u niego średniego stopnia stan zapalny wątroby. Obserwacje

te, jak również wyniki naszych badań, dotyczących odpowiedzi humoralnej indukowanej rIFN- α skłoniły nas do zbadania, czy eliminacja antygenów wzv B z surowicy i obecność anty-HBs wiąże się z całkowitą eliminacją wirusa.

W latach 1993-1997 pod kierunkiem Kliniki Gastroenterologii i Żywienia IP-CZD w Warszawie przeprowadzono wieloosrodkowe, otwarte, niekontrolowane studium oceny efektywności leczenia przewlekłego aktywnego wzv B rekombinowanymi preparatami interferonu-alfa (Intron A, Schering-Plough, Kenilworth, NJ; Roferon, Hoffman La Roche, Switzerland). Ogółem, z terenu całego kraju zgromadzono dane dotyczące 1689 leczonych dzieci. W 1 rok po zakończonej terapii u 910 pacjentów wykonano badania w kierunku obecności serologicznych wskaźników wzv B. U 91 z nich (10%) stwierdzono eliminację HBsAg/HBeAg z surowicy i obecność przeciwciał anty-HBs. Wszystkie te dzieci po upływie kilku lat od zakończonego leczenia zostały zaproszone do udziału w badaniach kontrolnych.

CEL PRACY

Celem pracy było uzyskanie odpowiedzi na następujące pytania: 1) czy w grupie dzieci z przewlekłym aktywnym wzv B, które odpowiedziały na leczenie rIFN- α eliminacją HBsAg/HBeAg i syntezą przeciwciał anty-HBs, serokonwersja utrzymuje się po upływie kilku lat od zakończenia terapii; 2) czy i u jakiego odsetka badanych obecny jest w surowicy HBV DNA mimo obecności przeciwciał anty-HBs.

MATERIAŁ I METODY

Do udziału w badaniach kontrolnych zgłosiło się 38 osób, w tym 24 płci męskiej i 14 płci żeńskiej w wieku od 5 do 22 lat (średnio 9,8 roku). Średni czas po podaniu ostatniej dawki rIFN- α wynosił 8 lat (zakres: 4-10 lat). U wszystkich badanych wykazano utrzymujące się w normie parametry biochemiczne funkcji wątroby (prawidłowe stężenie bilirubiny i aktywności ALT). Badania kliniczne wykazały dobry stan ogólny pacjentów, nie stwierdzono występowania hepatosplenomegalii ani innych objawów wskazujących na przewlekłą chorobę wątroby. W okresie prowadzonych badań żadna z osób nie otrzymywała antybiotyków, leków przeciwwirusowych i/lub immunomodulacyjnych. Grupę kontrolną stanowiło 19 osób (8 płci męskiej i 11 płci żeńskiej) w wieku od 6 do 45 lat (średnio 10 lat), które 5-13 lat wcześniej przebyły ostre wzv B. Do badań zakwalifikowano tylko te osoby, u których stwierdzono eliminację HBsAg/HBeAg, obecność anty-HBs, anty-HBc oraz prawidłowy poziom bilirubiny i ALT.

Od wszystkich osób pobrano krew żylną do próbek próżniowych bez dodatku antykoagulantów. Po wykrzepieniu krew odwirowano, a uzyskaną surowicę rozdzielono na małe porcje i zamrożono w -70°C do czasu analizy.

Badania wykonano za zgodą Komitetu Etycznego przy Instytucie „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie. Od osób dorosłych oraz rodziców badanych dzieci uzyskano pisemną zgodę.

U wszystkich pacjentów wykonano oznaczenia serologicznych markerów wzv B: HBsAg, HBeAg, anty-HBs, anty-HBe i anty-HBc przy użyciu aparatury i gotowych odczynników Abbott AXSYM System oraz oznaczenia przeciwciał anty-HCV. Do dalszych badań zakwalifikowano 37/38 pacjentów, u których stwierdzono obecność przeciwciał anty-HBs.

U każdego z nich wykonano następujące badania: 1) oznaczono miano przeciwciał anty-HBs, na podstawie którego obliczono wartość średniej geometrycznej (GMT; min.-max.); 2) przeprowadzono izolację krążących kompleksów immunologicznych (kki) i/lub nieswoistych agregatów białkowych metodą precypitacji przy użyciu 3.5% roztworu glikolu polietylenowego (PEG 6000); 3) po oddzieleniu supernatantów, osad poddano kwaśnej dysocjacji w buforze glicyna-HCl (pH 2.8), co pozwala na uwolnienie antygenów z kompleksów i ułatwia ich wykrywanie (11); 4) w „pełnej” surowicy, supernatantach i osadach oznaczono HBV DNA metodą PCR przy użyciu półautomatycznego systemu Cobas Amplicor HBV Monitor, Roche Diagnostic System (Branchburg, NJ, USA) zgodnie z instrukcją producenta. Limit wykrywalności wynosił 200 kopii HBV DNA/ml.

Istotność różnic między grupami badanymi określono nieparametrycznym testem Mann-Whitney, a korelacje między zmiennymi analizowano testem korelacji Spearmana. Wartość $p < 0.05$ przyjęto za istotną statystycznie.

WYNIKI

Markery w z w B. Po upływie 4-10 lat od zakończenia leczenia u 37 z 38 osób (97,4%), które zgłosiły się na badania kontrolne, obecne były przeciwciała anty-HBs, których poziom wykazywał znaczną, indywidualną zmienność. W grupie badanej, średnie miano przeciwciał (GMT) wynosiło 775 IU/L (zakres: 16-28500 IU/L) i było ok. 6-krotnie wyższe niż w grupie kontrolnej (GMT: 127 IU/L; zakres: 9-2105 IU/L) ($p < 0,01$). Obecność antygeny HBs stwierdzono u 2 dzieci (5,3%), w tym u 12-letniej dziewczynki (10 lat po leczeniu), u której nie wykazano obecności anty-HBs (została wykluczona z dalszych badań) oraz u 8,7-letniego chłopca (6 lat po leczeniu), u którego wykazano równoczesną

Tabela I. Serologiczna i kliniczna charakterystyka pacjentów leczonych rIFN- α oraz osób po naturalnej serokonwersji (grupa kontrolna)

Table I. Serological and clinical characteristics of patients treated with IFN- α and subjects after natural seroconversion (control group)

	Grupa badana N = 38	Grupa kontrolna N = 19
Wiek (w latach)*	9,7 (5 – 22)	10 (6 – 45)
M/K	24/14	8/11
Czas badania po serokonwersji (w latach)	8 (4 – 10)	9.5 (5 – 13)
ALT U/L (średnia)	14 \pm 11.5	18 \pm 8
HBsAg (+)	2/38	0/19
anty-HBs (miano IU/L)** (n=37)	775 (16 – 28500)	127 (9 – 2105)
anty-HBe (+)	21/38 (55%)	10/19 (53%)
anty-HBc (+)	38/38 (100%)	19/19 (100%)
anty-HCV (+)	0/38	0/19

* mediana \pm zakres; ** średnia geometryczna \pm zakres

obecność HBsAg i anty-HBs (217 IU/L). Przeciwciała anty-HBc obecne były u wszystkich badanych, natomiast anty-HBe u 21 z nich (55%). W żadnej z grup nie wykazano obecności przeciwciał anty-HCV. Serologiczną i kliniczną charakterystykę grupy badanej i kontrolnej przedstawiono w tabeli I.

HBV-DNA w surowicach i krążących kompleksach immunologicznych. Ogółem, HBV DNA w postaci wolnej lub związanej wykryto u 13 z 37 badanych (35,1%). W pełnej surowicy krwi wolny HBV DNA obecny był u 5 dzieci (13,5%), które zakończyły leczenie 4-10 lat wcześniej. Po wytrąceniu krążących kompleksów 3,5% roztworem PEG (swoiste i nieswoiste kki i/lub agregaty białkowe) wolny HBV DNA wykryto w 7 z 37 supernatantów (18,9%). U 5 z tych pacjentów w pełnej surowicy nie znaleziono materiału genetycznego wirusa. Ponadto, HBV DNA stwierdzono w 4 z 37 precipitatów (10,8%) i u 3 z tych pacjentów również nie wykryto wolnej formy wirusa. W grupie kontrolnej HBV DNA obecny był wyłącznie w pełnej surowicy u 3 z 19 osób badanych (15,8%). Nie wykazano korelacji między obecnością HBV DNA a czasem jaki upłynął od podania ostatniej dawki leku.

DYSKUSJA

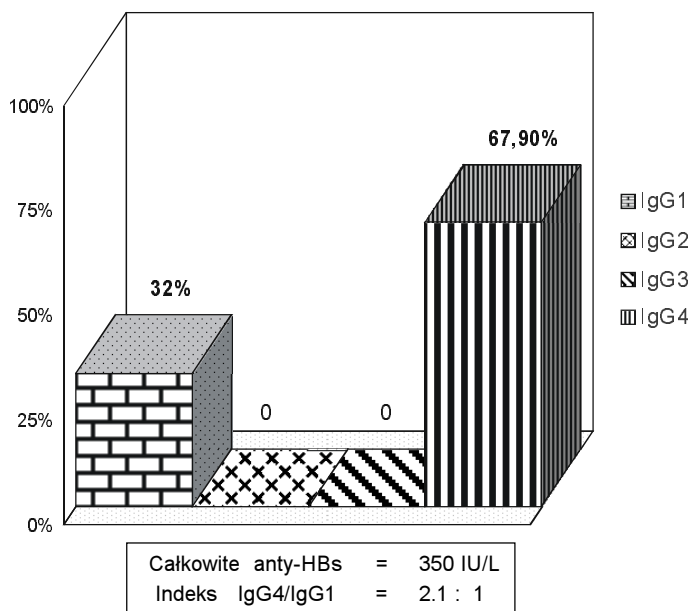
Po upływie 4 do 10 lat od zakońzonego leczenia, obecność HBsAg w surowicy stwierdzono u 5,3% pacjentów, co potwierdza wcześniejsze doniesienia, w których wykazano, że serokonwersja do anty-HBs w przewlekłym wzv B może być zjawiskiem przejściowym (10). Przez wiele lat uważano, że zanik HBsAg z surowicy i pojawienie się przeciwciał anty-HBs, którym towarzyszy normalizacja biochemicznych parametrów funkcji wątroby, wiąże się z eliminacją zakażenia (12). Miano całkowitych anty-HBs, bez określania ich izotypu, jest powszechnie stosowanym wskaźnikiem efektywnej odpowiedzi odpornościowej na HBsAg. Jednakże, w ostatnich latach ukazały się udokumentowane doniesienia dotyczące możliwości przetrwania wirusa w krążeniu wiele lat po eliminacji HBsAg, zarówno w wyniku naturalnej serokonwersji, jak i indukowanej terapią przeciwwirusową (9, 10, 13). W naszych wcześniejszych badaniach, wykonanych po upływie 1 roku od ostatniej dawki rIFN- α , pełną serokonwersję wykazaliśmy u 10% leczonych dzieci (14). Analiza syntezy przeciwciał anty-HBs w podklasach IgG wykazała znaczną, indywidualną zmienność profilu, niedającego się porównać z obrazem obserwowanym u ozdowieńców po ostrym wzv B. Szczególnie interesujący był wysoki udział w całkowitej odpowiedzi podklasy IgG4, której rola w eliminacji wirusów jest raczej wątpliwa (7). Powyższe obserwacje skłoniły nas do podjęcia dalszych badań w celu określenia częstości przetrwania wirusa u osób, które na podstawie kryteriów stosowanych w okresie prowadzonej terapii zostały uznane za wyleczone.

W grupie badanej, u 35,1% pacjentów przeciwciała anty-HBs „maskowały” obecność HBV DNA, który wykryliśmy w surowicy i/lub w krążących kompleksach immunologicznych, nawet po upływie 10 lat od zakończenia leczenia.

W „pełnej” surowicy krwi, wolny HBV DNA obecny był tylko u 5/37 badanych (13,5%). W celu potwierdzenia, że tak niska częstość występowania zgodna jest ze stanem faktycznym zbadaliśmy, czy obecność agregatów białkowych i/lub nieswoistych kki może blokować wykrywanie niskich poziomów HBV DNA. Ponadto zbadaliśmy, czy cząsteczki wirusa mogą występować w formie krążących kompleksów immunologicznych. Wyniki badań

wykazały, że usunięcie kki i/lub agregatów pozwoliło na wykrycie wolnego HBV DNA u kolejnych 5 osób (13,5%). U 4 pacjentów, HBV DNA obecny był w kompleksach immunologicznych, w tym u 3 z nich wolnego HBV DNA nie stwierdzono. Nasze obserwacje są sprzeczne z wynikami przedstawionymi przez *Yotsuyanagi* i wsp. (15), którzy u osób z obecnymi w surowicy przeciwciałami anti-HBs znajdowali HBV DNA wyłącznie w postaci kompleksów immunologicznych i na tej podstawie wysunęli hipotezę, że po serokonwersji wirus pozostający w krążeniu nie jest zakaźny.

Równoczesna obecność anti-HBs i HBV DNA wskazuje, że mimo aktywnej stymulacji syntezy przeciwciał u osób, u których wykryto HBV DNA, z niewyjaśnionych dotąd przyczyn nie dochodzi do eliminacji wirusa. Jednym z powodów takiej sytuacji może być zaburzenie mechanizmów, między innymi komórkowych, odpowiedzialnych za stymulację przeciwciał odpowiedniego izotypu, o silnych właściwościach wiązania i neutralizacji patogenu. W konsekwencji, znaczny odsetek syntetyzowanych przeciwciał może być mało efektywny, co pozwala wirusowi „umykać” przed odpowiedzią odpornościową gospodarza. Aby odpowiedzieć na to pytanie, w odrębnym studium zbadaliśmy rozkład anti-HBs w podklasach IgG i wykazaliśmy istotną statystycznie korelację między statusem HBV DNA a profilem swoistych podklas IgG. U osób, u których nie wykryliśmy HBV DNA, IgG1 i IgG3 stanowiły łącznie ok. 94% całkowitej odpowiedzi anti-HBs. Przeciwnie, w grupie osób, u których HBV DNA wykryto, IgG4 był drugim (średnia dla grupy), po IgG1, dominującym izotypem. Indywidualna analiza wyników wykazała, że u ok. 43% pacjentów z obecnym HBV-DNA, IgG4 była dominującą podklasą, stanowiącą od 54 do



Ryc. 1. Profil przeciwciał anti-HBs w podklasach IgG u chorego z obecnym w surowicy HBV DNA (przykład).

Fig. 1. The IgG subclass profile of anti-HBs antibodies in HBV DNA-positive patient (an example).

100% całkowitej odpowiedzi IgG anti-HBs (16). Przykład takiego rozkładu przeciwciał anti-HBs w podklasach IgG przedstawiono na ryc. 1. Biorąc pod uwagę fakt, że IgG4 nie aktywuje dopełniacza, nie odgrywa istotnej roli w zależnej od przeciwciał reakcji cytotoksyczności (ADCC), słabo wiąże się z receptorami Fc γ , jej udział w neutralizacji wirusów jest raczej wątpliwy. Na podstawie badań prowadzonych w różnych zakażeniach wirusowych, pasożytniczych i w chorobach o podłożu alergicznym przyjęto, że powszechna obecność tej podklasy jest typową, chociaż nie zawsze korzystną odpowiedzią na przewlekłą stymulację antygenową, co może mieć miejsce u osób z przetrwałym HBV DNA. Z jednej strony, brak wystarczającej ilości neutralizujących przeciwciał i odpowiednio aktywnej reakcji ADCC może przyczyniać się do przetrwania wirusa. Z drugiej strony, paradoksalnie, przewlekła stymulacja anti-HBs w podklasie IgG4 w ciągu wielu lat po serokonwersji może chronić gospodarza przed rozwojem poważnego procesu zapalnego, dzięki konkurencyjnemu wiązaniu (blokowaniu) receptorów antygenowych na zakażonych komórkach. Być może dlatego w grupie naszych pacjentów nie obserwowaliśmy objawów zapalenia wątroby (brak hepatomegalii, normalizacja parametrów funkcji wątroby) chociaż, ze względów etycznych, nie mogliśmy potwierdzić tego stanu badaniem histopatologicznym biopatów wątroby.

WNIOSKI

Najważniejsze obserwacje i wynikające z nich wnioski są następujące:

1. Eliminacja HBsAg z surowicy i pojawienie się przeciwciał anti-HBs u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu B leczonych rIFN- α , może być zjawiskiem przejściowym.
2. Nie wykazano korelacji między mianem całkowitych przeciwciał anti-HBs a skutecznością leczenia pzw B za pomocą interferonu alfa.
3. U pacjentów z serokonwersją do przeciwciał anti-HBs, HBV DNA może występować w postaci wolnej (77%) lub wyłącznie w postaci związanej w kompleksach immunologicznych (23%).
4. Oznaczanie HBV DNA w surowicy odgrywa istotną rolę w ocenie skuteczności leczenia pzw B.
5. Badanie profilu swoistych podklas IgG może być pomocne w przewidywaniu skuteczności zastosowanej terapii pzw B.
6. Wskazana jest okresowa kontrola serologicznych markerów wzw B: HBsAg, HBeAg, anti-HBs, anti-HBc oraz HBV DNA u pacjentów z przewlekłym wzw B, u których po leczeniu IFN- α nastąpiła serokonwersja do przeciwciał anti-HBs.

H Gregorek, K Dzierżanowska-Fangrat, M Woynarowski, P Józwiak, E Witkowska-Vogt, U Wojda, M Syczewska, J Socha, K Madaliński

PERSISTENCE OF HEPATITIS B VIRUS IN CHILDREN AFTER INTERFERON- α THERAPY DESPITE THE SEROCONVERSION IN HBsAg/ANTI-HBs SYSTEM

SUMMARY

Objective. The aim of our study was to assess: (1) whether seroconversion to IgG anti-HBs, induced by IFN- α therapy in children with chronic active hepatitis B, is maintained 4-10 years after treatment; and (2) whether HBV-DNA is present in circulation despite the synthesis of anti-HBs.

Methods. Serum samples were collected from 38 patients and serological markers of HBV were determined in each of them. HBV-DNA was determined by PCR in anti-HBs positive sera. Serum samples obtained from 19 subjects with a complete spontaneous seroconversion after acute HBV served as controls.

Results. Four to 10 years after therapy, anti-HBs were present in ca. 97.4% patients with GMT value of 775 IU/L vs 127 IU/L found in controls. HBsAg was found in 2/38 subjects. In 13 out of 37 patients (35.1%) free and/or bound HBV-DNA was present.

Conclusions. This study showed that seroconversion induced by IFN- α may not be a sustained phenomenon. HBV-DNA may persist for a long time after therapy despite the anti-HBs synthesis.

PIŚMIENNICTWO

1. Kuszewski K. Wirusowe zapalenie wątroby typu B oraz typu C w 1997 roku. *Przegl Epidemiol* 1999;53:75-82.
2. Chang MH. Chronic hepatitis virus infection in children. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13:541-48.
3. Scullard GH, Pollard RB, Smith JL, i in. Antiviral treatment of chronic hepatitis B virus infection. I Changes in vital markers with interferon combined with adenine arabinoside. *J Infect Dis* 1981;143:772-83.
4. Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995;13:29-60.
5. Robbins JB, Schneerson R, Szu SC. Perspective: hypothesis: serum IgG antibody is sufficient to confer protection against infectious diseases by inactivating inoculum. *J Infect Dis* 1995;171:1387-98.
6. Gregorek H, Madaliński K, Woynarowski M, i in. The IgG subclass profile of anti-HBs response in vaccinated children and children seroconverted after natural infection. *Vaccine* 2000;18:1210-1217.
7. Gregorek H, Madaliński K, Woynarowski M, i in. IgG subclass distribution of hepatitis B surface antigen antibodies induced in children with chronic hepatitis B infection after interferon- α therapy. *J Infect Dis* 2000;181:2059-62.
8. Michalak TI, Pasquinelli C, Guihot S, i in. Hepatitis B virus persistence after recovery from acute viral hepatitis. *J Clin Invest* 1994;93:230-39.
9. Bläckberg J, Kidd-Ljunggren K. Occult hepatitis B virus after acute self-limited infection persisting for 30 years without sequence variation. *J Hepatol* 2000;33:992-97.
10. Kato J, Hasegawa K, Torii N, i in. A molecular analysis of viral persistence in surface antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 1996;23:389-95.

11. Gregorek H, Jung A, Grabowka B, i in. Isolation and partial characterization of circulating immune complexes in sera of children with HBV-mediated glomerulonephritis. *Arch Immunol Ther Exp* 1991;39:519-27.
12. Perillo RP, Brunt E. Hepatic histologic and immunohistochemical changes in chronic hepatitis B after prolonged clearance of hepatitis B e antigen and hepatitis B surface antigen. *Ann Intern Med* 1991;15:113-15.
13. Akahane Y, Okada S, Sakamoto M, i in. Persistence of hepatitis B viremia after recovery from acute hepatitis B: correlation between anti-HBc titer and HBV-DNA in serum. *Hepatol Res* 2002;24:8-17.
14. Woynarowski M, Socha J, i in. (praca zbiorowa). Wyniki leczenia interferonem alfa dzieci z przewlekłym zapaleniem wątroby typu B. Doświadczenia z ośrodków polskich z lat 1990-1997. *Ped Pol* 1998;73:1031-41.
15. Yotsuyanagi H, Yasuda K, Iino S, i in. Persistent viremia after recovery from self-limited acute hepatitis B. *Hepatology* 1998;27:1377-82.
16. Gregorek H, Dzierżanowska-Fangrat K, Woynarowski M, i in. Persistence of HBV-DNA in children with chronic hepatitis B who seroconverted to anti-HBs antibodies after interferon- α therapy: correlation with specific IgG subclass responses to HBsAg. *J Hepatol* 2005;42:486-90.

Otrzymano: 2.03.2005 r.

Adres autora:

Hanna Gregorek
Instytut Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka
Zakład Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej
04-730 Warszawa, ul. Al. Dzieci Polskich 20
tel: 815 70 29
e-mail: hgreg@czd.waw.pl