

Aneta Kopacz<sup>1</sup>, Anna Bielecka<sup>1</sup>, Maria Mikulska<sup>1</sup>, Piotr Grabarczyk<sup>1</sup>, Paulina Zwolińska<sup>1</sup>, Beata Wojciechowska<sup>2</sup>, Magdalena Łętowska<sup>3</sup>, Elżbieta Kisiel<sup>4</sup>, Krzysztof Warzocha<sup>4</sup>, Bernadetta Ceglarek<sup>5</sup>, Andrzej B. Szczepaniak<sup>6</sup>, Andrzej Szczepiński<sup>7</sup>, Katarzyna Owczarska<sup>5</sup>, Konrad Pielaciński<sup>6</sup>, Ewa Brojer<sup>2</sup>

## ANALIZA WYSTĘPOWANIA MARKERÓW WIRUSA HBV ISTOTNYCH DLA RYZYKA REAKTYWACJI ZAKAŻENIA U OSÓB Z CHOROBIAMI HEMATOLOGICZNYMI

### ANALYSIS OF THE PREVALENCE OF HBV MARKERS RELEVANT TO THE RISK OF REACTIVATION OF INFECTION IN PATIENTS WITH HEMATOLOGIC DISEASES

Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

<sup>1</sup>Zakład Wirusologii

<sup>2</sup>Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej

<sup>3</sup>Zakład Transfuzjologii

<sup>4</sup>Klinika Hematologii

<sup>5</sup>Klinika Zaburzeń Hemostazy i Chorób Wewnętrznych

<sup>6</sup>Klinika Chirurgii Ogólnej i Hematologicznej

<sup>7</sup>Klinika Transplantacji Komórek Krwiotwórczych

#### STRESZCZENIE

W pracy oceniono częstość występowania markerów (HBsAg, anti-HBc, anti-HBs) istotnych dla określenia ryzyka reaktywacji wirusa HBV ze szczególnym uwzględnieniem ukrytego zakażenia (obecność DNA HBV przy braku HBsAg) u chorych leczonych w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii oraz zależności częstości wykrywania przeciwciał anti-HBc od wieku i płci. Antygen HBs wykryto u 3.4% (16/468), a przeciwciała anti-HBc świadczące o przebyciu zakażenia HBV u 21% (98/468) badanych osób. DNA HBV wykryto u 41/98 osób z przeciwciałami anti-HBc, a HBsAg wykryto u 13 z nich. U pozostałych 28 osób zakażenie miało charakter ukrytego zakażenia (HBsAg-/DNA HBV+). Obecność przeciwciał anti-HBs stwierdzono u 38% (163/430) chorych, w tym u 81 o mianie >100IU/l tj. chroniącym przed zakażeniem. Analizy wykazały, że ukryte zakażenie HBV występuje u około 6% osób z chorobami hematologicznymi. U większości z nich stwierdzono ochronny poziom przeciwciał anti-HBs.

**Słowa kluczowe:** ukryte zakażenie HBV, markery serologiczne HBV, anti-HBs, DNA HBV, reaktywacja HBV

#### ABSTRACT

The study assessed the incidence of HBV markers (HBsAg, anti-HBc, anti-HBs) important for determination of the risk of reactivation of infection, with particular interest of occult infection (presence of HBV DNA in the absence of HBsAg) in patients treated at the Institute of Hematology and Transfusion Medicine. Anti-HBc frequency was correlated with the age and sex of patients. HBsAg was detected in 16/468 examined patients, 98/468 (21%) were anti-HBc positive. HBV DNA was detected in 41/98 anti-HBc positives; in 13 simultaneously with HBsAg. 28 patients had occult HBV infection (HBV DNA+/HBsAg). Antibody to HBsAg was detected in 163/430 (38%) patients, 81 out of them on protective level (>100IU/l). It was shown that occult HBV infection occurs in approximately 6% of patients. In most of them the protective levels of anti-HBs are detected.

**Key words:** occult HBV, serological markers of HBV infection, anti-HBs, DNA HBV, HBV reactivation

#### WSTĘP

Zaburzenia układu immunologicznego występujące u osób z chorobami hematologicznymi, w tym te wynikające z podawania leków immunosupresyjnych

mogą być przyczyną reaktywacji zakażeń wirusowych. Ryzyko reaktywacji u chorych będących nosicielami antygeny HBs (HBsAg, antygen powierzchniowy HBs) jest dobrze udokumentowane i opisane w literaturze (1,2,3). Wiadomo, że reaktywacja może następować też

u osób, u których nie wykrywa się antygenu, a które w przeszłości przebyły zakażenie HBV (*hepatitis B virus*, wirus zapalenia wątroby typu B) (4,5,6). Należy podkreślić, że tylko u części zakażonych infekcja przebiega z żółtaczką i innymi objawami zapalenia wątroby; większość osób, które przebyły zakażenie nie jest więc tego świadoma. Za trwałe marker przebycia zakażenia HBV uważane są przeciwciała do rdzenia wirusa (anty-HBc, anti-hepatitis B core). Ich badanie u chorych nie jest przeprowadzane rutynowo. Wiedza na temat częstości ich wykrywania jest w Polsce, podobnie jak i w innych krajach niewielka.

W ostatnich latach zaobserwowano, że zwiększone ryzyko reaktywacji HBV występuje u osób z tzw. ukrytym zakażeniem (OBI, *Occult hepatitis B Infection*), definiowanym jako wykrywalność DNA wirusa HBV przy niewykrywalnym antygenie HBs w okresie innym niż wczesny okres zakażenia (okres okienka serologicznego). Ukryte zakażenie może mieć charakter przewlekły lub może występować w fazie zdrowienia, po zaniku HBsAg. U osób z OBI obecne są najczęściej przeciwciała anty-HBc – badanie tego markera jest więc używane jako test przesiewowy do ich identyfikacji. U części osób z ukrytym zakażeniem HBV wykrywane są też przeciwciała anty-HBs (*anti-hepatitis B surface antigen*, przeciwciała do antygenu powierzchniowego HBs), a u niektórych te przeciwciała mogą być jedynym markerem serologicznym. W czasie chemioterapii lub w wyniku upośledzenia układu immunologicznego spowodowanego chorobą czy leczeniem kortykosteroidami, antracyklinami czy przeciwciałami monoklonalnymi (anty-CD20, anty-CD52) może dojść do osłabienia wytwarzania m.in. przeciwciał anty-HBs, co zmniejsza obronę przeciwwirusową organizmu (2,5).

## MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano u 468 przypadkowo wybranych chorych leczonych w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii. Charakterystyka chorych przedstawiona jest w tabeli 1.

U chorych wykonywane były badania antygenu HBs *Architect HBsAg Qualitative/quantitative* (Abbott, Chicago, USA), przeciwciał anty-HBc *Architect anti-HBcII total and anti-HBc IgM* (Abbott, Chicago, USA) oraz przeciwciał anty-HBs *Architect anti-HBs* (Abbott, Chicago, USA). U osób, u których stwierdzono obecność anty-HBc wykonano badania DNA HBV *TMA Procleix HBV* (Chiron, USA; czułość testu 50IU/ml). Analizę statystyczną wykonano testem Persona Chi kwadrat, Statistica PL 9.

Tabela I. Charakterystyka chorych  
Table I. Characteristic of patients

Parametr	Liczba (odsetek)
Kobiety/ mężczyźni	212/256 (45,3%/54,7%)
Wiek średnia/ mediana	59/62
Liczba chorych otrzymujących przetoczenia krwi przed włączeniem do badań / liczba analizowanych (%) w tym: przetoczenia krwi przed rokiem 2005*	94/ 134 (70%); 84/ 134 (62%)
Średnia (mediana) liczba przetoczonych jednostek u chorych transfuzjonowanych	18,9 (15)
Rozpoznanie:	
Choroby rozrostowe krwi i nowotwory:	304 (65%)
-białaczki	129 (28%)
-chłoniaki	109 (23,3%)
-szpiczak plazmocytowy	60 (12,8%)
-nowotwory lite	6 (1,3%)
Nienowotworowe choroby krwi:	102 (21,8%)
-niedokrwistości aplastyczne	12 (2,6%)
-niedokrwistości o różnym podłożu	20 (4,3%)
-małopłytkowości (immunologiczne, wrodzone, wtórne)	10 (2,1%)
-zespoły mielodysplastyczne	56 (12%)
-hemofilie	4 (0,9%)
Inne (krwawienia, żylaki, marskość wątroby, stwardnienie guzkowe, miażdżyca, porfirie, toczeń układowy)	53 (11,3%)
Brak danych	10 (2,1%)
*do roku 2005 badania u krwiodawców wykonywano stosując testy w kierunku HBsAg, a po roku 2005 wprowadzono badania DNA HBV, co zmniejszyło ryzyko zakażenia przez przetoczenie	

## WYNIKI

W tabeli I przedstawiono charakterystykę badanych chorych. W analizowanej grupie było nieznacznie więcej mężczyzn niż kobiet. Średni wiek chorych wynosił 59 lat. Przetoczenia krwi przed włączeniem do obecnych badań otrzymywało 70% chorych, przy czym większość z nich (60%) otrzymywała przetoczenia również przed rokiem 2005, kiedy badania w kierunku HBV u krwiodawców wykonywano jedynie metodami serologicznymi badając antygen HBs, a nie jak to jest od roku 2005 dodatkowo analizując obecność DNA HBV. Największą grupę chorych stanowiły osoby z chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego (304 osoby). Ponad połowa chorych była leczona lekami immunosupresyjnymi, w tym 26% otrzymywało rytuksymab (ang. rituximab).

Przeciwciała anty-HBc, świadczące o przebyciu zakażenia HBV wykryto u 98/468 badanych chorych (21%) (tabela II). W próbkach osocza 82 osób anty-HBc dodatnich badano DNA HBV i wykryto go u 41 osób, HBsAg wykryto u 13 z nich. U pozostałych 28 osób z przeciwciałami anty-HBc zakażenie miało charakter ukrytego zakażenia (HBsAg-/DNA HBV+). Chorzy ci stanowili 6% ogółu analizowanych osób (tabela II).

Tabela II. Analiza wykrywania DNA HBV i HBsAg u chorych z przeciwciałami anti-HBc

Table II. Analysis of DNA HBV and HBsAg in patients with anti-HBc

Chorzy z przeciwciałami anti-HBc (dodatnich/badanych 98*/468 = 20,9%)	DNA HBV
HBsAg+/DNA HBV+	13
HBsAg+/DNA HBV nie badano	3
HBsAg-/DNA HBV+	28 (6% ogółu chorych)

W tabeli III zestawiono grupy chorych: bez markerów zakażenia HBV (anti-HBc ujemny) oraz z markerami przebytego zakażenia (anti-HBc dodatni) w tym: ukrytego zakażenia (anti-HBc+/DNA HBV+/HBsAg-), nosicielstwa anti-HBc (anti-HBc+/DNA HBV-) jak również aktywnego zakażenia (anti-HBc+/DNA HBV+/HBsAg+) wirusem HBV uwzględniając wiek i płeć. Wiek chorych w poszczególnych grupach nie różnił się istotnie. Różnice w rozkładzie płci również nie były statystycznie istotne.

U 430 osób wykonano badania stężenia przeciwciał anti-HBs. Ich obecność stwierdzono u 38% ogółu chorych. Wśród chorych z ukrytym zakażeniem anti-HBs wykryto u 19/25 (76%), przy czym u ponad 50% ich stężenie było wyższe niż 100 IU/l. Wśród 14 osób z wykrytym antygenem HBs – wytworzonego przeciwciała wykryto u 1 osoby. Wśród osób z wykrytym

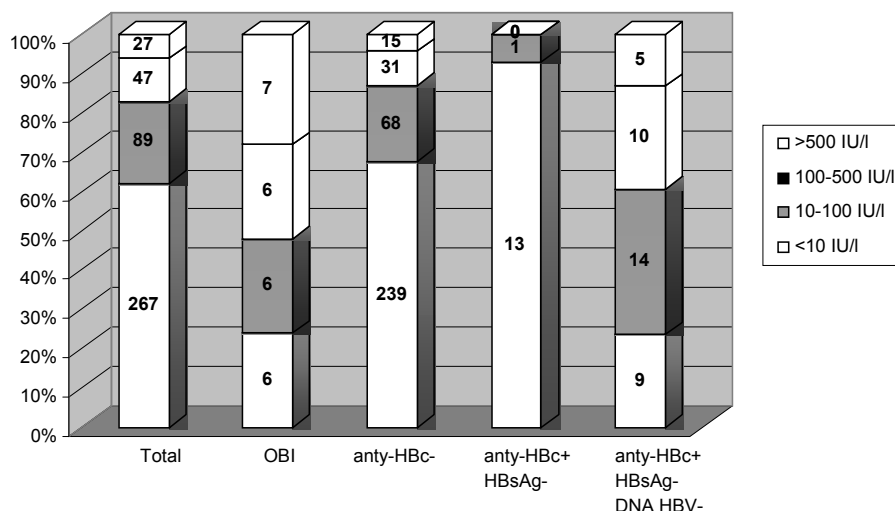
anti-HBc, a nie wykrytym DNA HBV przeciwciała anti-HBs stwierdzono u 29/38 (76.3%). W grupie bez przeciwciał anti-HBc odsetek osób z przeciwciałami anti-HBs wyniósł 32% (rycina I).

## DYSKUSJA

Nosicielstwo anti-HBc u osób z chorobami hematologicznymi leczonych w IHiT wyniosło 21% (98/468). Jest ono wyższe niż w populacji osób zdrowych, niezgłaszających jakichkolwiek zachowań zwiększających ryzyko zakażeń, którą reprezentują dawcy krwi (7%) (7). Odsetek osób z przeciwciałami anti-HBc w analizowanej grupie jest zbliżony do obserwowanego w grupie chorych dializowanych (19,5%)(8). Ponadto, z przeprowadzanych analiz wynika, iż odsetek chorych z wykrytym antygenem HBs (3,4%) wśród badanych osób jest wyższy niż w populacji generalnej podawanej dla Polski (1-2%) przez www.who.int. Większość analizowanych w obecnej pracy chorych miało w przeszłości przetoczenia krwi. Ponad 60% z nich otrzymywało przetoczenia przed rokiem 2005, czyli przed wprowadzeniem do krwiodawstwa testów DNA HBV. Badania te ograniczyły ryzyko przeniesienia zakażenia HBV przez przetoczenie składników krwi praktycznie do poziomu bliskiego zeru (9). Przed ich wprowadzeniem

Tabela III. Analiza wieku i płci chorych z markerami i bez markerów przebytego lub aktywnego zakażenia HBV

Parametr	anti-HBc –ujemni N=370	anti-HBc+ / HBsAg-/DNA HBV+ N=28 (ukryte zakażenie)	anti-HBc+/ HBsAg+/DNA HBV+ (N=13 aktywne zakażenie); DNA HBV NB (N=3 aktywne lub nosicielstwo)	anti-HBc+ / DNA HBV- N=38
Kobiety/Mężczyźni (% kobiet)	158/212 (43%)	16/12 (57%)	6/10 (37,5%)	24/14 (63%)
Wiek: średnia/ mediana	59/ 62	58/ 56	54/ 48	59/ 62



Rycina I. Analiza wykrywania i stężenia przeciwciał anti-HBs (IU/l), liczba chorych podana na słupkach

Figure I. Analysis of detection and concentration of anti-HBs (IU/l) number of patients on bars

ryzyko wynosiło około 1: 90 000; na taki poziom ryzyka wskazuje częstość wykrywania DNA HBV u krwiodawców bez jakichkolwiek markerów serologicznych („okienko serologiczne”), która wynosiła 4/358 000 przebadanych donacji (10).

Jak wiadomo częstość wykrywania antygeny HBs jest wyższa u chorych, którzy mają częsty kontakt z placówkami medycznymi. U chorych po przeszczepach nerki częstość HBsAg wynosiła 4.4 w 2006 (11), a w pracy ostatnio opublikowanej przez *Grzegorzewską* i wsp 2.64% (8). Jest prawdopodobne, że wykrycie HBsAg u analizowanych chorych z IHiT jest wynikiem reaktywacji wcześniej przebytego zakażenia. U wszystkich 16 nosicieli antygeny HBs wykrywano przeciwciała anti-HBc, a u ponad 90% nie wykrywano ochronnych przeciwciał anti-HBs. Należy podkreślić, że w badanej przez nas grupie chorych wszyscy byli urodzeni przed rokiem 1990 tj. przed wprowadzeniem obowiązku szczepień na wzvB (wirusowe zapalenie wątroby typu B) u noworodków. Badania nad reaktywacją HBV u osób z chorobami hematologicznymi dowodzą, że u wszystkich nosicieli anti-HBc może potencjalnie ponownie rozwinąć się wzv B. Największe zagrożenie reaktywacją występuje u osób, u których wykrywa się antygen HBs. Z badań przeprowadzonych w wielu ośrodkach wynika, że u 19-48% osób, rozwój choroby prowadzi do ciężkich powikłań, a nawet śmierci (12). Dlatego, w przypadku wykrycia u chorego HBsAg stosuje się dokładną diagnostykę zakażenia HBV i włączane jest leczenie wyprzedzające (13).

Wiele doniesień wskazuje, że ryzyko reaktywacji występuje też u osób z ukrytym zakażeniem HBV. W przebadanej przez nas grupie osoby z OBI stanowiły 6% (28/468) analizowanych chorych. Badania kliniczne dotyczące reaktywacji w analogicznej grupie chorych onkohematologicznych przeprowadzone we Włoszech, wykazały, że doszło do niej u 11/75 analizowanych pacjentów (14). *Hui* i wsp. w swojej pracy przedstawili, że u chorych na chłoniaki OBI było przyczyną wzvB u 3,3% (8/244) badanych, a 3 osoby z tej grupy rozwinęły piorunujące zapalenie wątroby (5). Podobnie *Umemura* i wsp. wykazali reaktywację HBV u 4% (23/552) pacjentów, u których stosowano chemioterapię, wcześniej wyleczonych z wzv B (15). Analiza licznych prac na temat reaktywacji HBV w powiązaniu ze stosowanym leczeniem wykonana przez *Yeo* i wsp. dowodzi, że u 25% osób z OBI leczonych rytuxymabem rozwija się wzvB, z których 20% umiera z powodu zapalenia wątroby (16).

Badania przeprowadzane przez nas nie zakładały analiz klinicznych – będzie to przedmiotem dalszych badań.

Wszyscy eksperci w zakresie badań nad wirusem HBV są zgodni, że decydującą rolę w zapobieganiu rozwinięcia zakażenia HBV odgrywa obecność ochron-

nych przeciwciał anti-HBs wytwarzanych po kontakcie z wirusem lub po szczepieniu. W naszej analizie anti-HBs wykryto u 163 osób. W grupie chorych z ukrytym zakażeniem występowały one w stężeniu >10 IU/l u 19/25 (76%) chorych, a u 13/25 (52%) chorych z tej grupy to stężenie było wyższe niż 100 IU/l. Za poziom chroniący przed zakażeniem wirusem u osób immunokompetentnych uznawane jest stężenie przeciwciał anti-HBs powyżej 10 IU/l, dla osób o osłabionej odporności powyżej 100 IU/l (17). Przedstawione wyniki wskazują, że zwiększone ryzyko reaktywacji w grupie chorych analizowanych w tej pracy dotyczy 24-50% osób z OBI. Ryzykiem reaktywacji zakażenia HBV obarczona jest też ta grupa chorych, u których jedynym wykrywalnym markerem zakażenia są przeciwciała anti-HBc. Według analiz autorów japońskich wynosi ono 1-23,8%. Chorzy, u których dochodziło do reaktywacji, w większości przypadków nie mieli wykrywalnych przeciwciał anti-HBs (18). W analizowanej przez nas grupie osób z anti-HBc ochronny poziom przeciwciał anti-HBs wykrywano u blisko 80% osób.

Należy podkreślić, że ważnym czynnikiem dla oceny ryzyka reaktywacji zakażenia, poza markerami serologicznymi, jest poziom DNA-emi HBV. Wzrost DNA HBV w osoczu jest pierwszym markerem wskazującym na replikację wirusa. Namnażanie się wirusa może doprowadzić do niszczenia zakażonych hepatocytów przez układ immunologiczny w przerwach podawania i/lub po odstawieniu immunosupresantów czy chemioterapii.

Ze względu na dużą częstość występowania anti-HBc i ukrytego zakażenia HBV w badanej grupie chorych oraz licznych doniesień na temat reaktywacji u osób z chorobami hematologicznymi wskazane są regularne badania markerów wirusa HBV oraz markerów uszkodzenia wątroby.

## PIŚMIENNICTWO

1. Lalazar G, Rund D, Shouval D. Screening, prevention and treatment of viral hepatitis B reactivation in patients with haematological malignancies. *British J Haematol* 2007;136: 699-712.
2. Liang R. How I treat and monitor viral hepatitis B infection in patients receiving intensive immunosuppressive therapies or undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2009;113: 3147-53.
3. Yeo W, Ho WM, Hui P i in. Lamivudine for the prevention of hepatitis B virus reactivation in HBsAg seropositive cancer patients undergoing cytotoxic chemotherapy. *J Clin Oncol* 2004; 2: 927-934.
4. Lok ASF LR, Chiu EK W, i in. Reactivation of hepatitis B virus replication in patients receiving cytotoxic therapy: Report of prospective study. *Gastroenterology* 1991: 182-8.



5. Hui CK, Liang R, Lau GK. Kinetics of hepatitis B virus reactivation after chemotherapy: More questions than answers - Reply. *Gastroenterology* 2006;131: 1656-7.
6. Yeo WN, Chan TC, Leung N W Y i in. Hepatitis B Virus Reactivation in Lymphoma Patients With Prior Resolved Hepatitis B Undergoing Anticancer Therapy With or Without Rituximab. *J Clin Oncol* 2009;27: 605-11.
7. Kusmierczyk J, Zatorska J, Ras J i in. Prevalence of anti-HBc antibodies in blood donors in the South Region of Poland. *Vox Sang* 2006;91: 56.
8. Grzegorzewska AE, Kurzawska-Firlej D, Ratajewski W i in. Antibodies to Core Antigen of Hepatitis B Virus in Patients on Renal Replacement Therapy: Association with Demographic, Clinical and Laboratory Data. *Nephron Clin Pract* 2010;114: C194-C203.
9. Candotti D, Allain J-P. Transfusion-transmitted hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2009;51: 798-809.
10. Brojer E, Grabarczyk P, Liszewski G i in. Characterization of HBV DNA(+)/HBsAg(-) blood donors in Poland identified by triplex NAT. *Hepatology* 2006;44: 1666-74.
11. Rutkowski B L-NM, Grenda R, Czekalski R i in. *Report on the Renal Replacement Therapy in Poland-2006*. Gdańsk: Drukonsul; 2008.
12. Lau GKK. Hepatitis B reactivation after chemotherapy: two decades of clinical research. *Hepatol Intern* 2008;2: 152-62.
13. Brojer E, Occult B infection in haematology and blood transfusion. *Acta Haematol Pol* 2009;40: 435-49.
14. Ferraro D, Pizzillo P, Di Marco V i in. Evaluating the risk of hepatitis B reactivation in patients with haematological malignancies: is the serum hepatitis B virus profile reliable? *Liver International* 2009;29: 1171-7.
15. Umemura T, Tanaka E, Kiyosawa K i in. Japan de Novo Hepatitis BRG. Mortality secondary to fulminant hepatic failure in patients with prior resolution of hepatitis B virus infection in Japan. *Clin Inf Dis* 2008;47: 52-6.
16. Yeo W, Chan PKS, Zhong S i in. Frequency of hepatitis B virus reactivation in cancer patients undergoing cytotoxic chemotherapy: A prospective study of 626 patients with identification of risk factors. *J Med Virol* 2000;62: 299-307.
17. Madaliński K. Recent advances in Hepatitis B vaccination. *Hepatitis B Annual* 2008;5: 51-65.
18. Kusumoto S, Tanaka Y, Mizokami M i in. Reactivation of hepatitis B virus following systemic chemotherapy for malignant lymphoma. *Int J Hematol* 2009;90: 13-23.

Otrzymano: 29.09.2011 r.

Zaakceptowano do druku: 23.11.2011 r.

**Adres do korespondencji:**

Instytut Hematologii i Transfuzjologii  
Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej  
00-957 Warszawa, ul. Chocimska 5  
tel./fax: (22) 3496611  
e-mail: ebrojer@ihit.waw.pl  
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Ewa Brojer