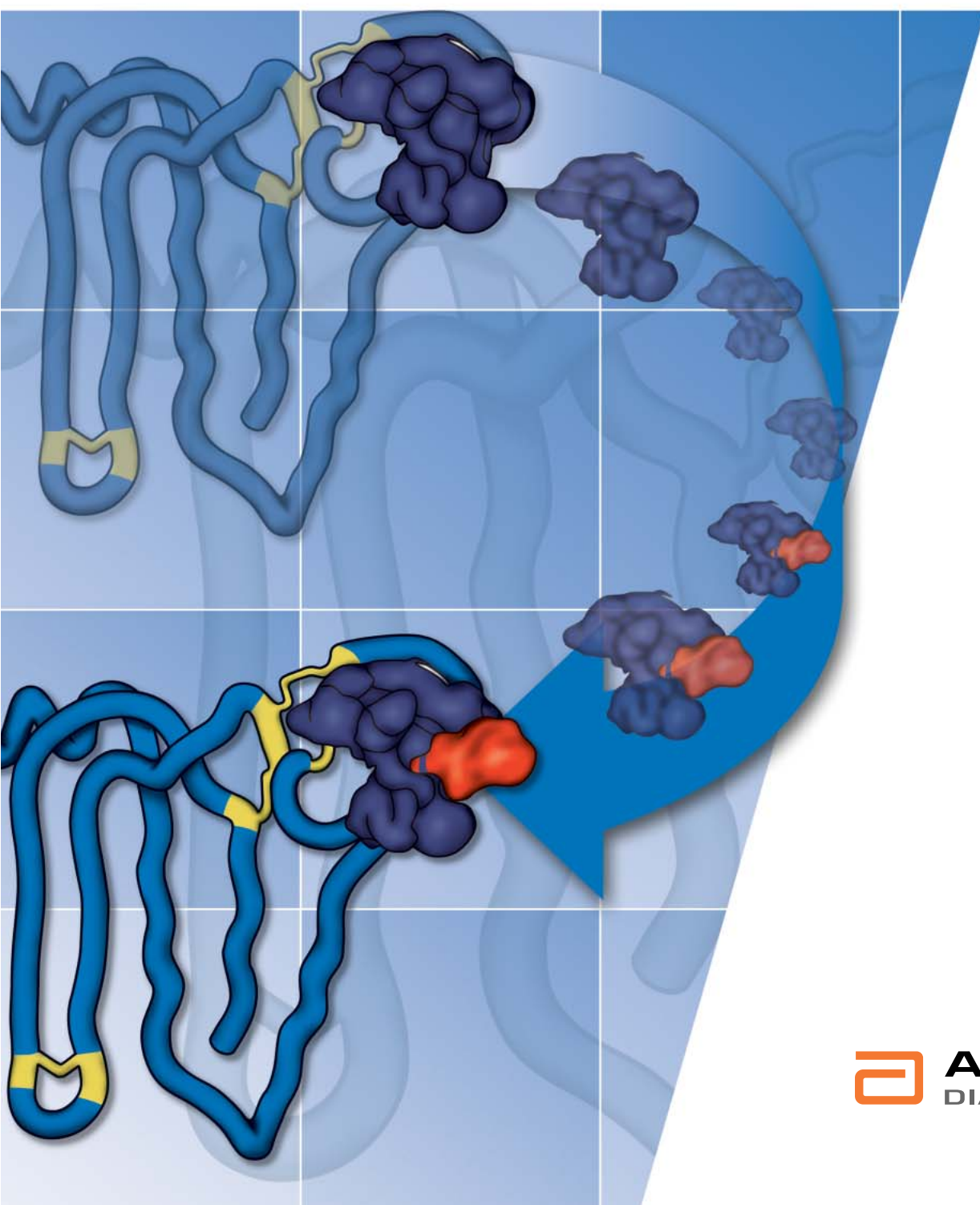


Mutanty HBsAg

Nowe wyzwanie w diagnostyce zakażenia wirusem
zapalenia wątroby typu B



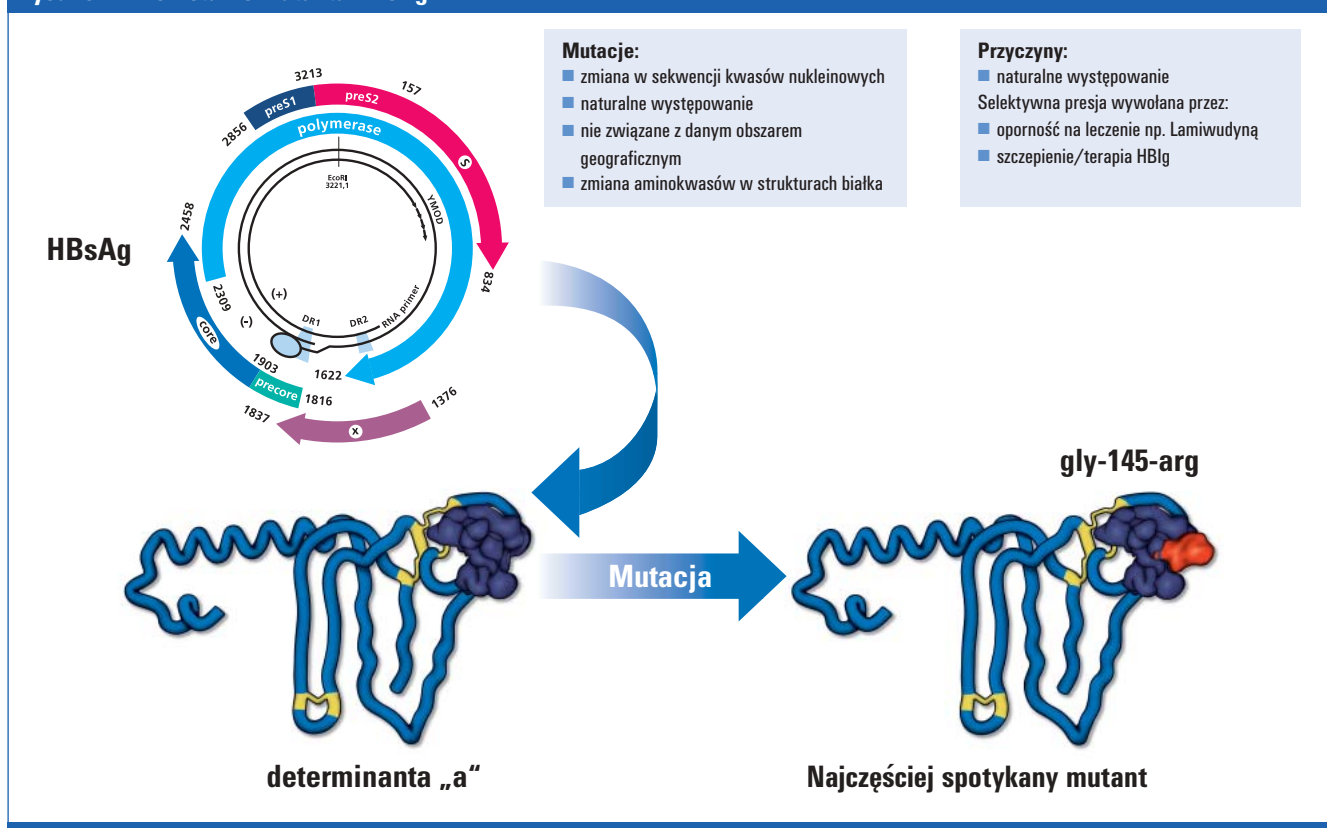
Mutanty HBsAg

Białko powierzchniowe wirusa zapalenia wątroby typu B (HBsAg) jest najważniejszym markerem serologicznym w diagnozowaniu zakażenia HBV. Z tego względu czułość testów służących do wykrywania HBsAg była przedmiotem ciągłego udoskonalania, a badania skryningowe dawców, jak i diagnostyka ostrego i przewlekłego zakażenia HBV stoją w chwili obecnej na bardzo wysokim poziomie. Jednakże pojawienie się na przestrzeni ostatnich 10 lat zmutowanych form HBsAg stało się nowym wyzwaniem w serologii, gdyż formy te potrafią w taki sposób zmienić typową determinantę „a” tego powierzchniowego antygeny, że nie jest on wykrywany przez przeciwciała stosowane w całym szeregu testów komercyjnych.

Co to jest mutant HBsAg?

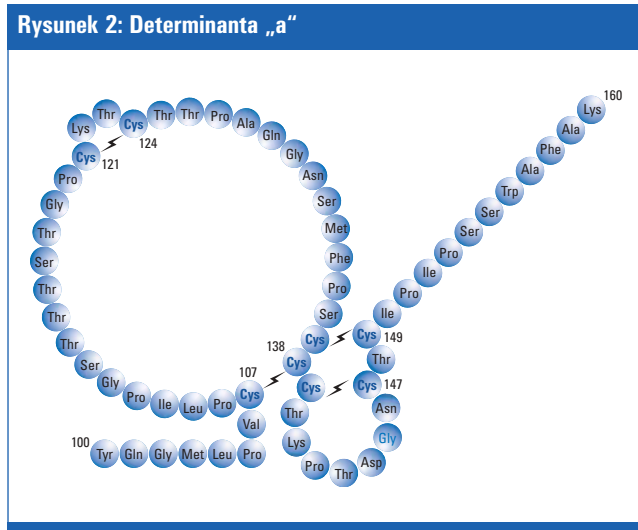
Mutant HBsAg jest wirionem HBV o zmienionej strukturze epitopów, będącej wynikiem substytucji, delecji bądź insercji jednego lub kilku aminokwasów w determinancie „a” (patrz: Rys. 1). Mutanty „ucieczki” antygeny powierzchniowego pojawiają się u osób na skutek interwencji medycznych lub naturalnie wywołanej selektywnej presji immunologicznej, a o niektórych wiadomo, że są stabilne i przenoszone drogą horyzontalną. Zmutowane formy wykryto u pacjentów zakażonych HBV pomimo pomyślnie przeprowadzonych szczepień lub przy niewystarczającej ochronie z użyciem immunoglobulin u pacjentów po przeszczepach. Literatura opisuje też przypadki reaktywacji pozornie wyleczonego zakażenia HBV u pacjentów z ciężką immunosupresją. Nie tak dawno opisano przypadek dawcy, u którego wykryto mutant „ucieczki”. Na skutek powszechnie obserwowanej tendencji do przeprowadzania szczepień, częstość występowania mutantów wzrosła zgodnie z przewidywaniami modelu matematycznego, w którym zakłada się, że dziki szczep HBV zniknie w ciągu około 100 lat. Obecnie częstość występowania mutantów HBsAg wśród osób po szczepieniach szacuje się na 2 do 28 %.

Rysunek 1: Powstanie mutantu HBsAg



Dlaczego zmutowane formy HBsAg nie są wykrywane przez testy?

Metody wykrywania HBsAg, oparte na użyciu konkretnych przeciwciał, których zadaniem jest wychwycenie i wykrycie HBsAg, zakładają ich zdolność do wykrywania form zmutowanych. Interesujący jest fakt, że najczęściej spotykanym mutanem jest forma, w której glicynę zastępuje arginina w pozycji 145 determinanty „a” (patrz: Rys. 2). Ponieważ epitop ten jest wysoce immunogeny, pobudza on większość przeciwciał neutralizujących HBsAg po przebytej infekcji. Równocześnie wiele testów do wykrywania HBsAg wykorzystuje przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko epitopowi z sekwencji aminokwasów 140 do 145. Zastosowanie przeciwciała monoklonalnego w wysoce konserwatywnym regionie, lub grupy określonych przeciwciał monoklonalnych mających zdolność łączenia się z częścią poza strukturą białka – s sprawia, że układ taki posiada zdolność łączenia się z antygenem, gdy zastosujemy kombinację z przeciwciałami poliklonalnymi. Może się to okazać najlepszym rozwiązaniem przy wykrywaniu całego szeregu znanych mutantów.



W kilku badaniach, porównujących zdolność licencjonowanych testów immunodiagnostycznych do wykrywania mutantów genu S (patrz: Tabela 1), wykorzystano głównie antygeny rekombinowane (w surowicy negatywnej) w celu przebadania najczęstszych mutacji opisanych w literaturze fachowej, w związku z trudnością uzyskania wystarczającej ilości próbek naturalnych (pochodzących od osób zakażonych).

Tabela 1: Wykrywalność mutantów HBsAg przy użyciu różnych analizatorów

Panel	rekombinowane mutanty HBsAG	AxSYM* (Abbott)	Centaur* (Bayer)	Elecsys* (Roche)	Vitros* (J & J)	Murex** (Abbott)	Prism** (Abbott)	Architect** (Abbott)
1	Thr 126 to Ser	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.
2	Gln 129 to His	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.
3	Met 133 to Leu	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.
4	Asp 144 to Ala	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.
5	Gly 145 to Arg	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.
6	Pos. Control	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.
7	Thr 126 to Ser and Gly 145 to Arg	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.
8	Pro 142 to Leu and Gly 145 to Arg	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.
9	Pro 142 to Ser and Gly 145 to Arg	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.
10	Asp 144 to Ala and Gly 145 to Arg	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.
11	Neg. Control	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Panel	zawierający „naturalne” mutanty							
1	Gly 145 to Ala	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.
2	Pro 120 to Gln, Thr 131 to Lys, Gly 145 to Ala	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.
3	Thr 118 to Val, Met 133 to Ile, Phe 134 to Asn, Pro 142 to Ser, Thr 143 to Leu and Gly 145 to Lys	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.
4	Thr 115 to Asn, Pro 120 to Leu, Met 133 to Ile, Tyr 134 to His, Asp 144 to Val and Ser 154 to Pro	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.

* Dane opublikowane w: B. Moerman et al., Clin. Lab. 2004; 50:159–162; ** do użytku wewnętrznego

Opisy przypadków wykrycia zmutowanego HBsAg

Niżej opisane przypadki wystąpienia mutantów HBsAg, jakie przedstawiono ostatnio na forum europejskim, świadczą o coraz większej liczbie tego typu przypadków na całym świecie, nie tylko zaś na obszarach endemicznych, takich jak Azja Środkowowschodnia.

1. Dawca krwi ze Słowenii

Opublikowano w: J Clinical Lab 2004; 50:49–51; Snezna Levicnik-Stezinar.

W kwietniu 2003 zanotowano przypadek 42-letniej pierwszorazowej dawczyni, u której stwierdzono obecność antygeny HBsAg w oznaczeniu testem Prism HBsAg. Badaną próbkę oznaczono powtórnie w laboratorium przy pomocy testu skryningowego: Ortho HBsAg EIA system 3 i wykazano, że jest ona powtarzalnie ujemna. Następnie oznaczono ją przy użyciu testów: AxSYM HBsAg v 2.0, Murex HBsAg v 3.0 oraz Ortho Vitros ECi HbsAg. Zarówno test AxSYM, jak i Murex wykazały, że próbka ta jest silnie dodatnia, zaś wynik testu Ortho Vitros ECi był ujemny. Oznaczenie w kierunku wszystkich pozostałych markerów wykazało, że próbka ta pochodzi od zdrowego nosiciela wirusa zapalenia wątroby typu B (anty-HBc-dodatnia, anty-HBe-dodatnia) bez widocznych objawów choroby. Badanie HBV DNA – 4120 kopii/ml. Sekwencjonowanie wykazało obecność kilku substytucji, z których najważniejszą było zastąpienie treoniny przez leucynę w aminokwasie 143.

Wstępny wynik testu HBsAg:

Prism: Dodatni
Ortho EIA: Ujemny

Kolejne wyniki testu HBsAg:

Ortho Vitros ECi: Ujemny
AxSYM: Dodatni
Murex: Dodatni

Abbott's Viral Discovery Group Analysis: Genotyp D, serotyp ayw3

Mutacje substytucyjne w pozycjach:

- treonina przez serynę (T114S)
- lizyna przez argininę (K122R)
- aspargina przez treoninę (N131T)
- fenyloalanina przez tyrozynę (F134Y)
- treonina przez leucynę (T143L)

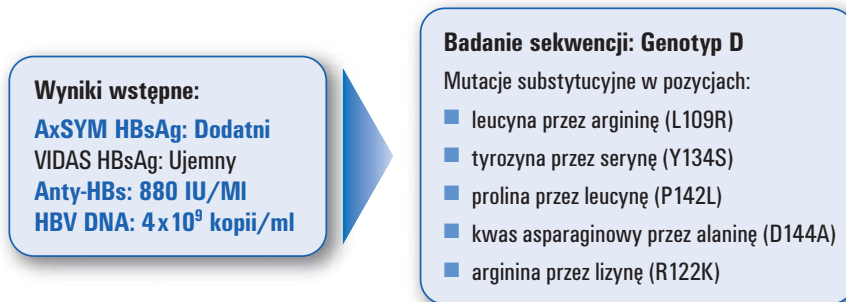
2. Reaktywacja zakażenia WZW typ B podczas leczenia immunosupresyjnego chłoniaka złośliwego. Przypadek I

Opublikowano w: Blood, 2003; 102:1930; T. Westhoff et al., University Clinics B. Franklin, Berlin.

Pacjent pochodzący z Libanu z rozpoznaniem przed 15 laty zakażeniem wirusem zapalenia wątroby typu B został przyjęty do szpitala w Berlinie na chemioterapię. Przed rozpoczęciem terapii pacjent był: anty-HBc-ujemny i anty-HBs-dodatni (>1000 IU/l), lecz HBsAg-ujemny.

W 2002 pacjenta poddano czteromiesięcznej chemioterapii (wg schematu CHOP), a następnie dwumiesięcznemu leczeniu rituximabem (anti-B cell mab). Po leczeniu u pacjenta wystąpiły objawy ostrego zapalenia wątroby typu B, a badane próbki okazały się wysoce dodatnie w teście AxSYM HBsAg, lecz ujemne w teście VIDAS HBsAg. Poziom przeciwciał anti-HBs wynosił 880 IU/l, a próbka była HBV DNA-dodatnia i zawierała 4×10^9 kopii/ml. Instytut PEI prowadził dalsze badania, w których dwa testy nie wykazały obecności HBsAg, a jeden test dał wynik słabo dodatni, nie potwierdzony w teście neutralizacji. Pacjent zmarł w 2 tygodnie później pomimo leczenia lamiwudyną.

Sekwencjonowanie wykazało obecność czterech mutacji HBsAg: L109R, Y134S, P142L, D144A, oraz zmiany podtypu R122K.



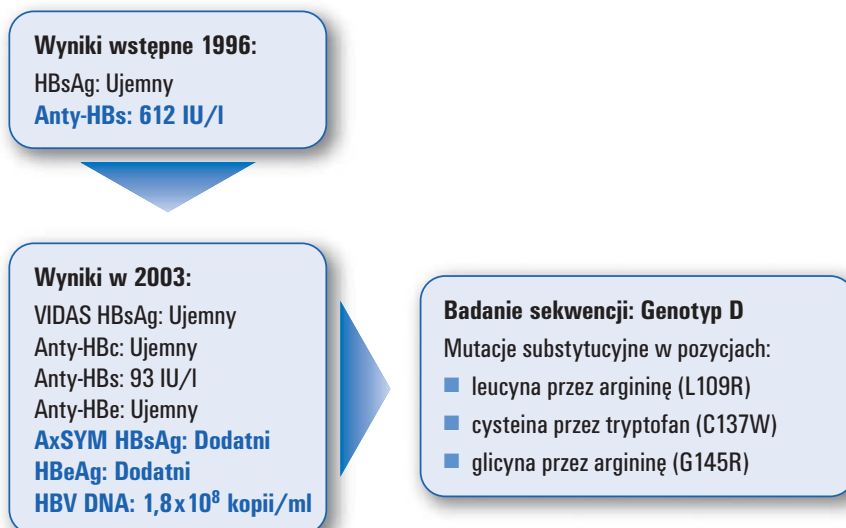
3. Reaktywacja zakażenia WZW typ B podczas leczenia immunosupresyjnego chłoniaka złośliwego. Przypadek II

Opublikowany przez: R. Kaiser, H. Pfister and W. Gerlich, Cologne and Giessen, 2003

Pacjent pochodzący z Włoch, z rozpoznaniem chłoniaka złośliwego, poddawany był od 1989 kilku chemioterapiom w Kolonii, Niemcy. W 1996 pacjent był HbsAg-ujemny i anty-HBc-ujemny, lecz wartości przeciwciał anti-HBs utrzymywały się na poziomie 612 IU/l. Pacjenta nie szczepiono przeciw HBV.

W 2003 pacjent został poddany czterem cyklom chemioterapii, a 4-tego lipca 2003, jeszcze w trakcie chemioterapii wynik testu AxSYM HBsAg był silnie dodatni, zaś testu VIDAS – HBsAg-ujemny. Pacjent okazał się anty-HBc-ujemny i anty-HBe-ujemny, a poziom przeciwciał anti-HBs wynosił 93 IU/l. Wynik HBeAg był dodatni, a test PCR wykazał obecność HBV DNA – $1,8 \times 10^8$ kopii/ml.

Próbka pobrana 20-ego lutego 2003 została oznaczona retrospektywnie i wykazano w niej 4×10^4 HBV kopii/ml, HBV genotyp D oraz mutacje HBsAg: L109R, C137W, G145R. Jest to przypadek, w którym zakażenie HBV zostało reaktywowane, ale ze względu na obecność formy zmutowanej nie zostało ono wykryte przy użyciu testu VIDAS HBsAg.



Austria

Abbott Ges.m.b.H.
Diagnostics
Perfektastrasse 86
1230 Wien
Tel. (+43) 1 89 122 0
Fax (+43) 1 89 122 44

Belgium/Luxembourg

Abbott S.A./N.V.
Parc Scientifique
Rue du Bosquet 2
BE-1348 Louvain-la-Neuve
Tel. (+32) 10 47 53 11
Fax (+32) 10 47 53 34

Croatia

Abbott Representative Office
Planinska bb
10000 Zagreb
Tel. (+385) 1 23 50 560
Fax (+385) 1 24 41 331

Czech Republic

Abbott Laboratories s.r.o.
Hadovka Office Park
Evropska 2590/33d
160 00 Praha 6
Tel. (+420) 2 672 92 111
Fax (+420) 2 672 92 233

Denmark

Abbott Laboratories A/S
Diagnostics
Smakkedalen 6
2820 Gentofte
Tel. (+45) 39 77 00 00
Fax (+45) 39 77 01 99

Egypt (MEN)

ADD Egypt
13 Sheikh Sharawi St.
Sheraton Area/Heliopolis
Cairo
Tel. (+20) 2 2 68 49 31
Fax (+20) 2 2 68 49 21

Finland

Abbott Oy
Diagnostics
Pihatörmä 1A
02240 Espoo
Tel. (+358) 9 75 18 42 1
Fax (+358) 9 75 18 41 50

France

Abbott France S.A.S.
12, Rue de la Couture
Silic 203
94518 Rungis Cedex
Tel. (+33) 1 45 60 25 00
Fax (+33) 1 45 60 04 98

Germany

Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Tel. (+49) 6122 580
Fax (+49) 6122 581244

Greece

Abbott Laboratories
(Hellas) S.A.
Diagnostics
512 Vouliagmenis Avenue
174 56 Alimos, Athens
Tel. (+30) 2 10 99 85 171
Fax (+30) 2 10 99 58 361

Hungary

Abbott Kft.
Globe 13 Irodahaz
Teve utca 1/a-c. 6 em.
1139 Budapest
Tel. (+36) 1 465 2100
Fax (+36) 1 465 2199

Ireland

Abbott Diagnostics
4051 Kingswood Drive
Citywest Business Campus
Dublin 24
Tel. (+353) 1 469 1560
Fax (+353) 1 469 1565

Italy

Abbott S.p.A.
Abbott Diagnostics
Via Mar della Cina 262
00144 Rome
Tel. (+39) 06 52 99 11
Fax (+39) 06 52 99 14 36

Latvia

Abbott Laboratories S.A.
Latvian Representative Office
34, Bruinieku str.
Riga, LV-1011
Tel. (+371) 7 31 48 23
Fax (+371) 7 31 48 38

Netherlands

Abbott B.V.
Siriusdreef 51
2132 WT Hoofddorp
Tel. (+31) 23 55 44 500
Fax (+31) 23 55 44 577

Norway

Abbott Norge AS
Nesøyveien 4, Postboks 123
N-1376 Billingstad
Tel. (+47) 81 55 99 20
Fax (+47) 66 98 39 09

Poland

Abbott Laboratories
Poland Sp. z o.o.
ul. Domaniewska 41
02-672 Warsaw
Tel. (+48) 22 606 10 50
Fax (+48) 22 606 10 80

Portugal

Abbott Laboratórios Lda.
Diagnostics
Rua Cidade de Córdova, 1A
Alfragide
2720-100 Amadora
Tel. (+351) 21 472 72 00
Fax (+351) 21 472 72 00

Romania

Abbott Laboratories
Representative Office Romania
(Diagnostics Division)
No 133, Calea Serban Voda
Et. 1, Corp B, Sector 4
70517 Bucharest
Tel. (+4021) 3 36 86 00
Fax (+4021) 3 36 86 42

Russian Federation

Abbott Laboratories S.A.
9, Dmitrovsky per.
103031 Moscow
Tel. (+7) 0952 5842 70
Fax (+7) 0952 5842 71

Saudi Arabia

Mediserv
P.O.B. 40758
Riyadh 11511
Tel. (+966) 14 6122 26
Fax (+966) 14 6133 39

Slovak Republic

Abbott Laboratories
Slovakia s.r.o.
Trnavska cesta 70
82102 Bratislava 2
Tel. (+421) 2 444 54 188
Fax (+421) 2 444 54 420

South Africa

Abbott Laboratories (Pty) Ltd.
Abbott Place
219 Golf Club Terrace
Constantia Kloof
Roodepoort 1709
Tel. (+27) 11 858 2000
Fax (+27) 11 858 2130

Spain

Abbott Científica S.A.
Costa Brava, 13
28034 Madrid
Tel. (+34) 91 337 3400
Fax (+34) 91 734 9664

Sweden

Abbott Scandinavia AB
Gårdsvägen 8, 169 70 Solna
Tel. (+46) 8 5465 6700
Fax (+46) 8 5465 6800

Switzerland

Abbott AG
Diagnostics
Neuhofstrasse 23
6341 Baar
Tel. (+41) 41 768 44 44
Fax (+41) 41 768 44 50

Turkey

Abbott Laboratuvarlari
Ekinciler Cad. Hedef Plaza
Kat 4 Kavacyk-Beykoz
34810 Istanbul
Tel. (+90) 216 5 38 74 00
Fax (+90) 216 4 25 09 78

United Arab Emirates

Abbott Laboratories S.A.
API World Tower
off. no. 403/4th floor
Sheikh Zayed Road
Dubai
Tel. (+971) 43 327 862
Fax (+971) 43 327 904

United Kingdom

Abbott Laboratories Ltd.
Diagnostics
Abbott House, Norden Road
Maidenhead, Berkshire
SL6 4XF, England
Tel. (+44) 16 28 7840 41
Fax (+44) 16 28 6442 05



Immunossay



Molecular



Clinical Chemistry



Haematology



Blood Glucose



Point of Care