
Sympóziu laboratórnej diagnostiky

Diagnostika vírusovej hepatitídy B

Lenka Helmová

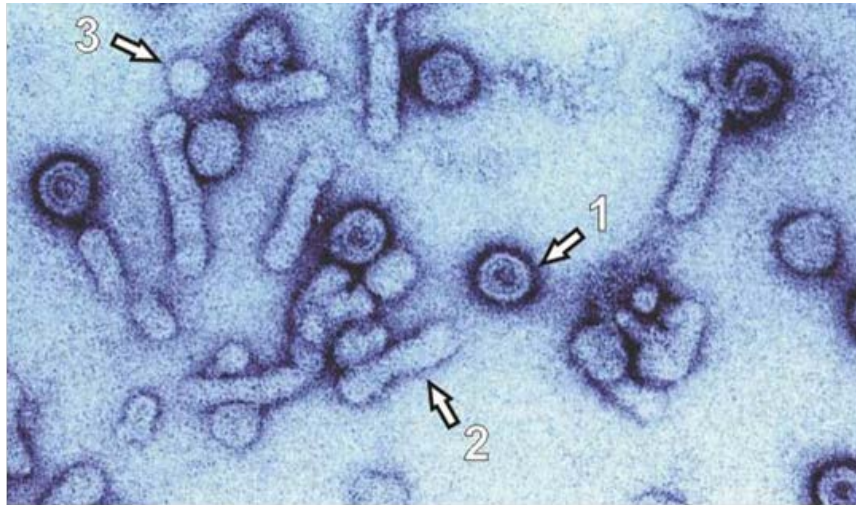
September 10- 11, 2015 in Vígľaš



Vírusová hepatitída B

- je vírusové ochorenie postihujúce pečeň
- prenos – vertikálny (matka – dieťa)
 - horizontálny (krvou, telesnými tekutinami infikovaného)
- priebeh - akútny alebo chronický (imunosupresia)
- 80-90% ochorení u detí do 1 roka prejde do chronickej VHB
- 30-50% ochorení u detí do 6 roka prejde do chronickej VHB
- < 5-10% ochorení dospelých prechádza do chronickej VHB
- cca 400 miliónov ľudí s chronickou hepatitídou B
- u 20-30% chorých s chronickou formou sa vyvinie cirhóza, karcinóm
- 780 000 ľudí ročne umiera na komplikácie chronickej VHB

Vírus Hepatitídy B

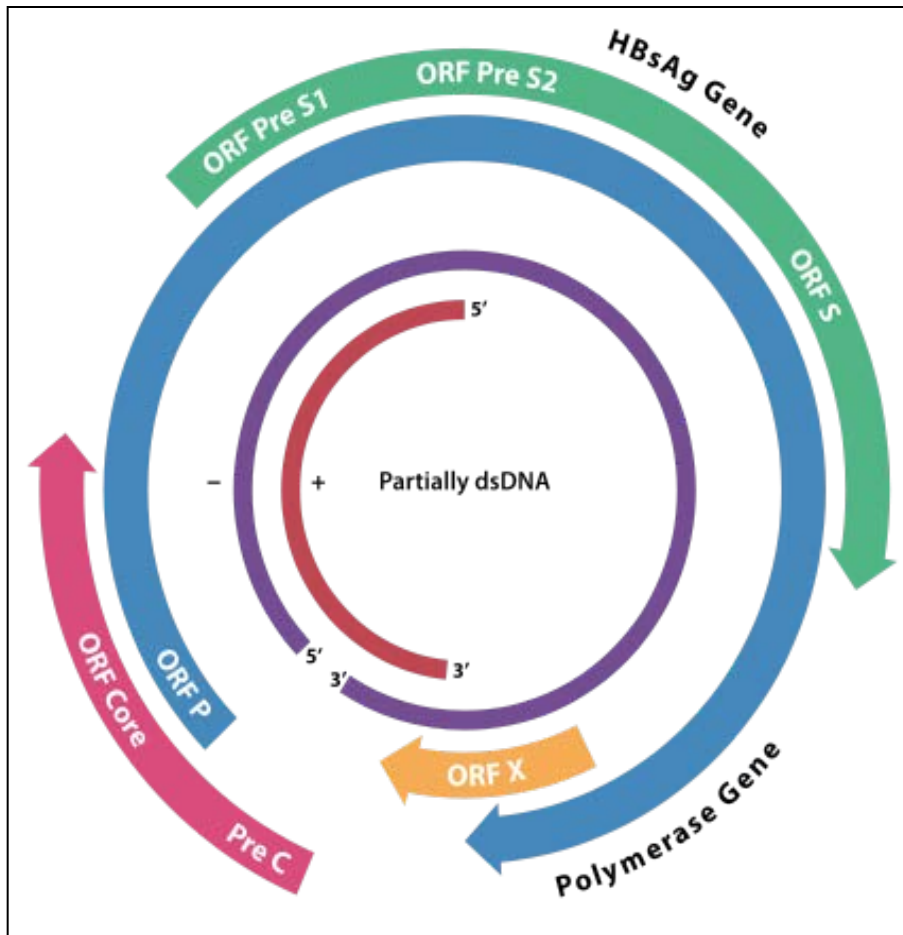


- čeľaď Hepadnaviridae, rod Orthohepadnavirus
- obalený ds/ss DNA vírus, na replikáciu využíva reverznú transkriptázu
- 3 typy vírusových častíc – Daneova častica /1/(infekčná), filamentózna /2/ a sféricka /3/ častica (neinfekčné)

HBV naj...

- najmenší genóm z DNA vírusov - 3200 párov báz
 - asymetrické vlákna
- replikácia - reverzná transkriptáza
- vysoko odolný - obalený - 7 dní pri izbovej teplote
- 3 typy vírusových častíc - 42 nm Daneova častica – infekčná
 - 20 nm sférická častica – neinfekčná
 - 20 nm vláknitá častica – neinfekčná

Vírus Hepatitídy B – genóm HBV



- mínus vlákno – tvorí takmer úplný kruh, na 5' konci pripojená RT
- plus vlákno – neúplné, zakončené krátkym úsekom RNA
- existuje 8 genotypov (A-H) HBV (aspoň 8% rozdiel v nukleotidoch)

A - Európa, u nás prevláda

B a C - Ázia

D - celosvetovo

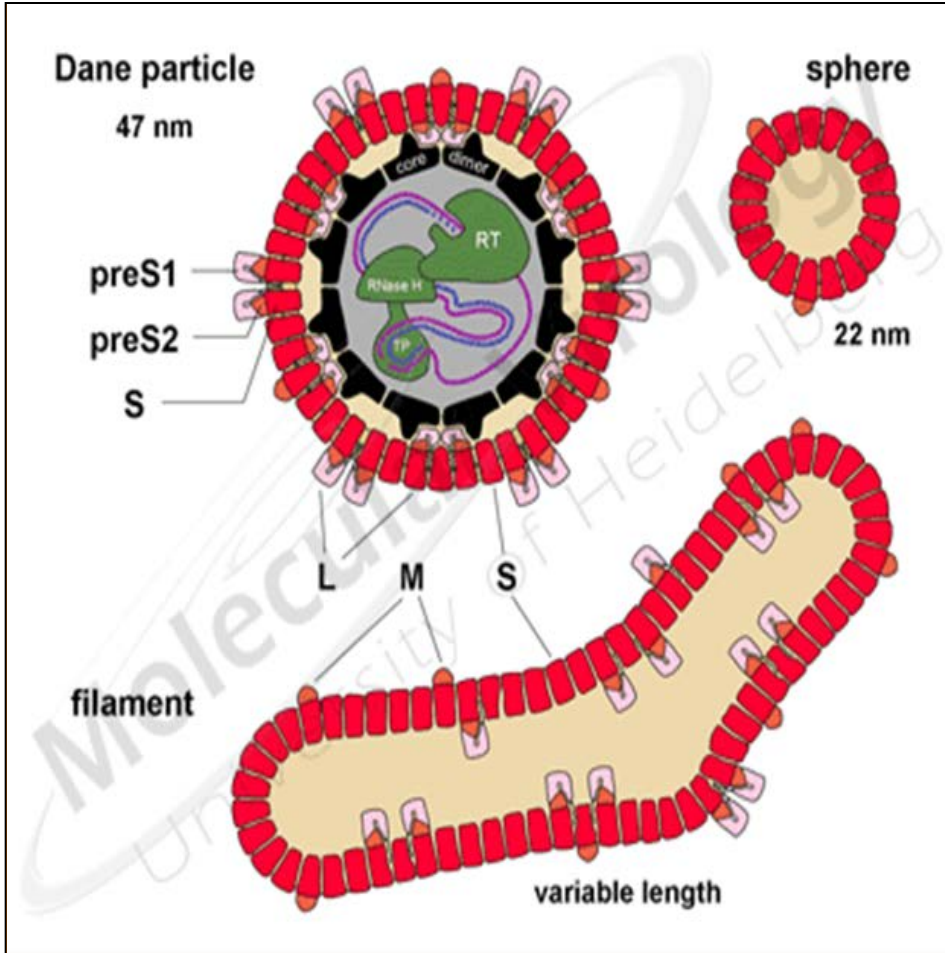
E - Afrika

F - J. Amerika

G - Európa – mediterian

H - Stredná Amerika

Vírus Hepatitídy B – antigénne zloženie

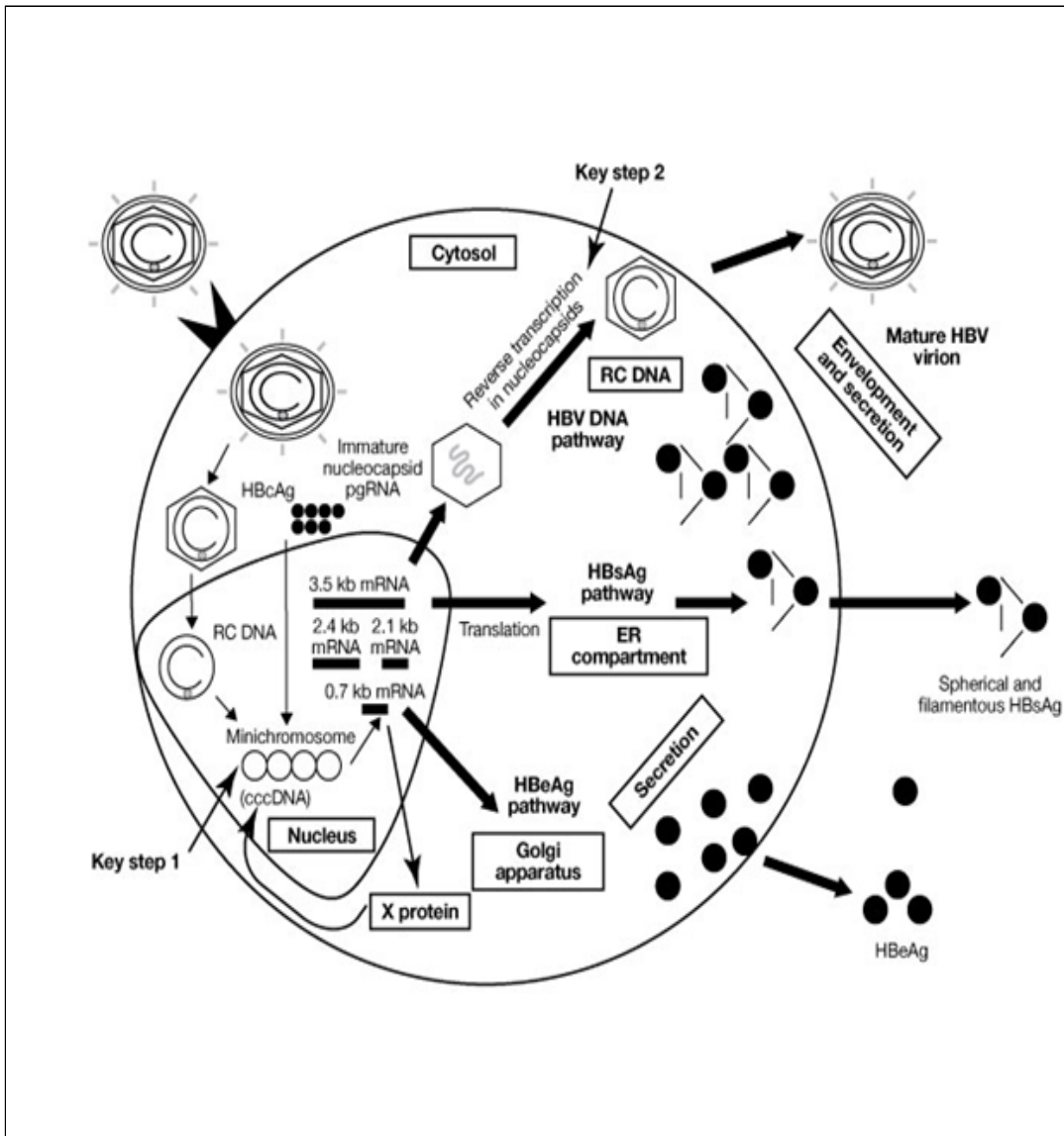


HBsAg - S,M,L (kódované úsekom preS1, preS2 a S)

HbcAg – fosfoprotein nukleokapsidy (kódovaný úsekom genómu C)

HBeAg – sekrečný (kódovaný úsekom preC)

Vírus Hepatitídy B - replikácia



→ väzba HBV na hepatocyt
 → prienik genómu do jadra
 → dokončenie syntézy plus vlákna → **kovalentne uzavretá cirkulárna DNA (ccc DNA)**

→ transcripcia na mRNA

(4 typy – najdlhšia tzv. **pregenomová mRNA**)

→ **reverznou transkripciou** prepísaná do minus DNA vlákna (RT = mutácie génu, najčastejšia pre-core = HBeAg)

Priebeh VHB

- inkubačná doba cca 2-3 mesiace
- príznaky spôsobuje imunitný systém
- priebeh - akútna infekcia – HBsAg menej ako 6 mesiacov
 - asymptomatická , abortívna, anikterická, ikterická , fulminantná
 - sérokonverzia aHBs, aHBe, aHBc
- chronická infekcia – HBsAg viac ako 6 mesiacov
 - fibróza, cirhóza, HCC

Sérologická diagnostika vírusovej hepatitídy B

markery hepatitídy B:

- HBsAg screening (cut-off 0,9-1,0) – **reaktívny/nereaktívny**
- HBsAg konfirmačný test – neutralizačný (hodnota po vysýtení s anti HBs $\leq 60\%$)
– **pozitívny/negatívny**
- HBeAg (cut-off = 1,0)
- anti HBs (hranica pozitivity 10 IU/ml, rozsah 2-1000 IU/ml)
- anti Hbe – kompetetívny - (cut-off = 1,0)
- anti HBc / anti HBc IgM - kompetetívny - (cut-off = 1,0)

HBV DNA PCR diagnostika

- vhodné vzorky – sérum alebo plasma
- detekcia konzervatívnych častí core a pre-core oblasti
- aj detekcia pre-core mutant
- detekcia HBV DNA – IU/ml alebo kópie/ml
- merací rozsah 20 – 170 000 000 IU/ml

- vyjadruje **mieru replikácie vírusu = vírusovú nálož**
- umožňuje sledovanie efektu terapie – pokles o 2 log 10 IU/ml

Kvantitatívne stanovenie HBsAg

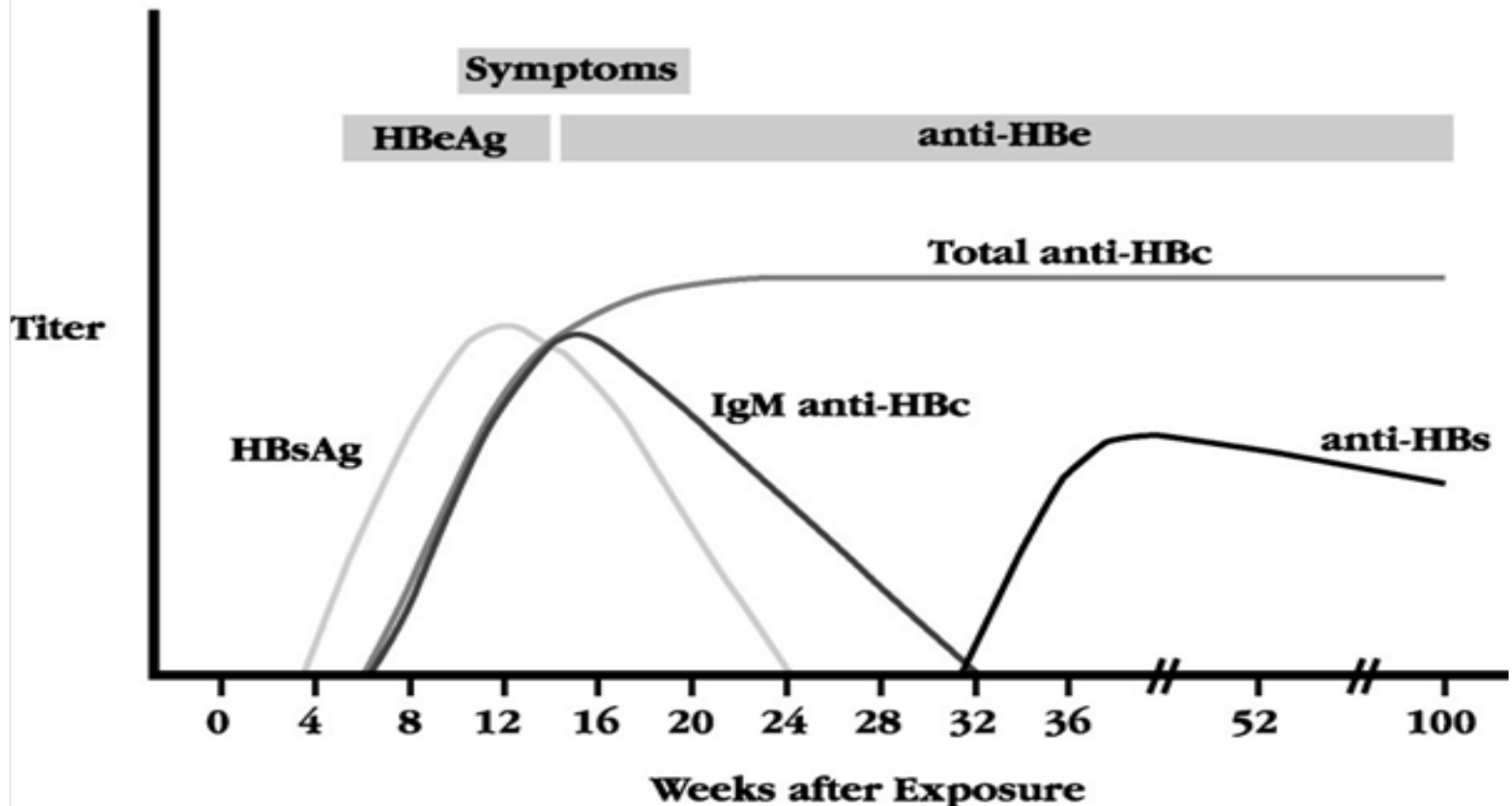
- monitoring prirodzeného priebehu infekcie
- prediktívny faktor odpovede na terapiu pri CHB
- kvantifikácia HBsAg v IU/ml
- vyjadruje **mieru infikovanosti buniek**

- na trhu diagnostické sety 3 výrobcov - výsledky nie sú plne kompatibilné
 - ⇒ sledovaného pacienta vyšetrovať vždy rovnakým setom (výsledky z jedného laboratória)

- ElektroChemiLuminiscenčná Imuno Analýza (ECLIA)
rozsah merania 5 – 13 000 IU/ml (1 300 000)

Akútna hepatitída B – typický priebeh

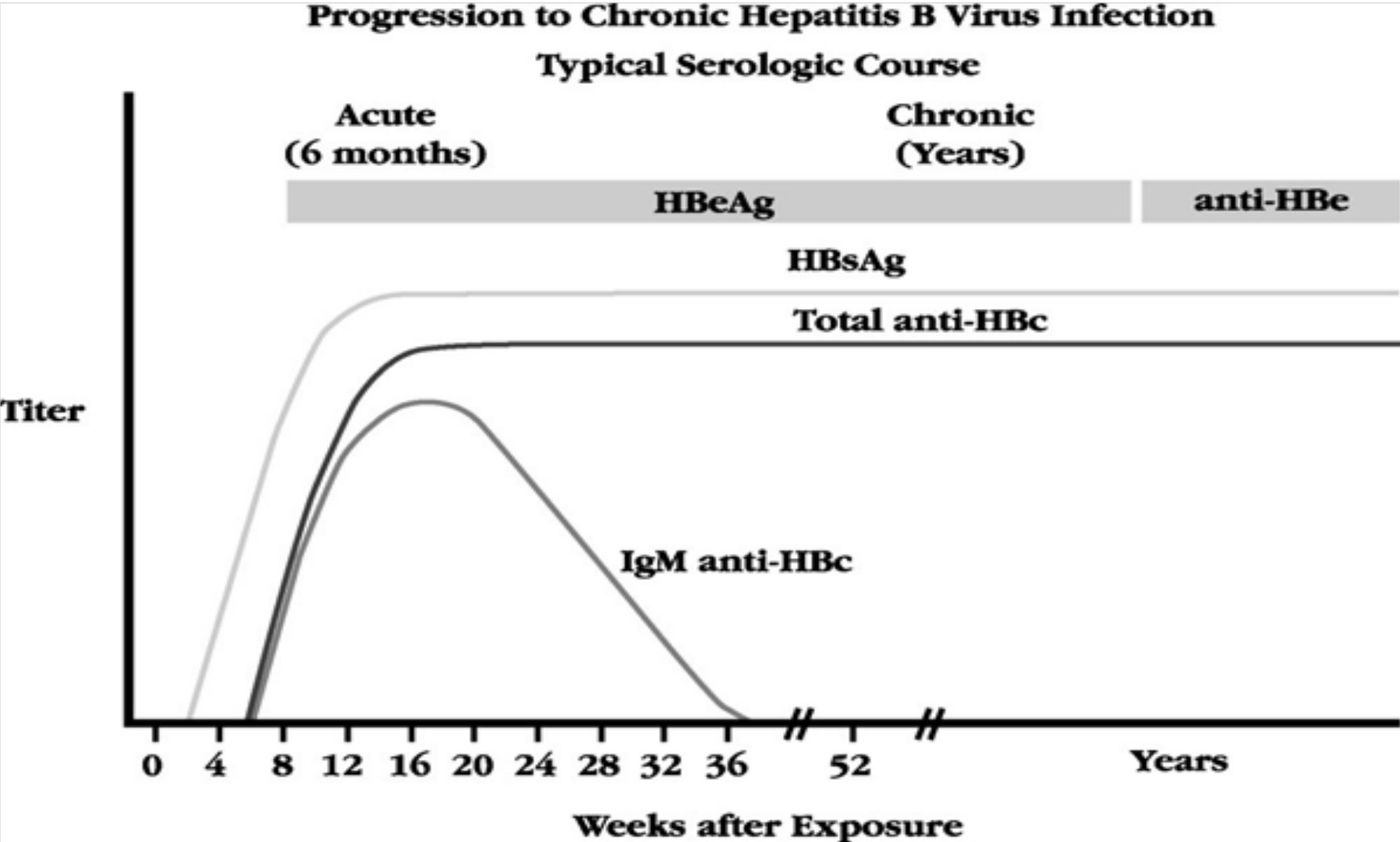
**Acute Hepatitis B Virus Infection with Recovery
Typical Serologic Course**



VHB – sérologický nález

- HBsAg + → inkubačná doba
 - **HBsAg + , HBeAg + , anti HBc IgM+** → typický nález po nástupe symptómov
 - HBeAg + , anti HBc + → HBsAg sérologické okno
 - HBsAg + , anti HBc + → HBeAg sérologické okno, pre core mutanta
 - anti HBc + → HBsAg/HBeAg sérologické okno
 - zriedka – súbežná pozitivita HBsAg/HBeAg a anti HBs/Hbe
 - antiHBe + → málo pravdepodobný nález
 - **HBsAg a anti HBc negat** veľmi pravdepodobne nie je hepatitída B
- + nález → dispenzarizovať hepatologická/infektologická ambulancia**

Chronická hepatitída B – typický priebeh



Chronická hepatitída B - fázy

- Imunotolerantná fáza - HbeAg pozit, ↑ HBV DNA, ↑ **HBsAg**, norm. ALT
 - ↓ inflamácia a fibróza
 - môže trvať roky
 - vysokokontagiózna
- Imunoreaktívna HBeAg pozit fáza
 - HBeAg pozit, ↓ HBV DNA, ↑ ALT
 - ↑ inflamácia a fibróza
 - trvá týždne až roky

Chronická hepatitída B - fázy

- Inaktívny HBV nosič – môže nastúpiť po sérokonverzii na antiHBe

veľmi ↓ až nedetekovateľné HBV DNA v sére

normálne ALT (a 3 mes. 1 rok)

qHBsAg < 1000 IU/ml

- sérokonverzia anti HBs
- progresia k CHB (HBeAg negatívnej)

Chronická hepatitída B - fázy

- HBeAg negat CHB - po sérokonverzii z HBeAg na antiHBe počas imunoreaktívnej fázy alebo z fázy inaktívneho nosičstva
 - HbeAg negat – mutácia pre core oblasti génu
 - periodická reaktivácia
- ⇒ fluktuácia hladiny HBV DNA a ALT v sére
- qHBsAg > 1000 IU/ml**
- aktívne ochorenie pečene – fibróza, cirhóza, HCC

Chronická hepatitída B - fázy

- HBsAg negat fáza – nedetekovateľná HBV DNA v sére
 - anti HBc pozit
 - anti HBs +/-
- imunosupresia môže viesť k reaktivácii
- cirhóza pred vymiznutím HBsAg – riziko HCC

Prevenca vírusovej hepatitídy typu B

- očkovanie - povinné (3.,5.,11. mesiac), ohrozené skupiny
- novorodenci HBsAg pozitívnej matky - do 24 hodín očkovanie
 - ľudský gamaglobulín s ↑ antiHBs
- zdravotnícky pracovníci po susp. infikovaní
 1. preveriť či bol zdravotník očkovaný – stanoviť hladinu antiHBs
 2. vyšetriť vzorku od pacienta
 3. ak pacient pozitívny a zdravotník neočkovaný → podať ľudský gamaglobulín s ↑ antiHBs
→ zaočkovať

Terapia vírusovej hepatitídy typu B

- **akútna VHB** – symptomatologická liečba (hepatoprotektíva, alkoholová abstinencia, vitamíny...)
- **chronická VHB**
 1. Pegylovaný interferón α – účinok antivírusový, antiproliferatívny, imunomodulačný
 - + nevzniká rezistencia, úplná remisia
 - časté nežiadúce účinky
 2. Nukleotidové/nukleozidové analógy – Tenofovir, Lamivudín, Adefovir, Telbivudin, Entecavir
 - zabudovanie do HBV DNA – blokovanie replikácie
 - + zriedkavé nežiadúce účinky
 - Lamivudín – rýchly vznik rezistencie (selekcia mutovanej formy)

Sledovanie qHBsAg počas terapie CHB PEG-IFN α

1. HBeAg pozit CHB

-pre genotyp B a C - v 12 týždni terapie

ak qHBsAg \leq 20 000 IU/ml \Rightarrow pokračovať v th

ak qHBsAg $>$ 20 000 IU/ml zastavenie/zmena th

- pre všetky genotypy – v 24 týždni terapie

ak qHBsAg \leq 20 000 IU/ml \Rightarrow pokračovať v th

ak qHBsAg $>$ 20 000 IU/ml zastavenie/zmena th

Sledovanie qHBsAg počas terapie CHB PEG-IFN α

2. HBeAg negat CHB

- pre všetky genotypy – v 12 týždni terapie

zníženie kvantity HBsAg oproti bazálnej hodnote

pokles HBV DNA $\geq 2 \log 10$ IU/ml oproti bazálnej hodnote

\Rightarrow pokračovať v th

bez poklesu kvantity HBsAg a $< 2 \log 10$ IU/ml pokles HBV DNA

\Rightarrow zastavenie/zmena th

Sledovanie qHBsAg počas terapie CHB NAs

HBeAg pozit aj negat

nedetekovateľná HBV DNA v sére

v 24 týždni pri liečbe lamivudínom alebo telbivudínom

v 48 týždni pri liečbe adefovirom

⇒ nízke riziko vzniku rezistencie a predpoklad trvalej vírusovej odpovede

pokles HBsAg kvantity

⇒ predpoklad sérokonverzie na antiHBe a antiHBs

Naše prvé skúsenosti s qHBsAg

- vyšetrených – 54 pacientov
- chronická hepatitída B
 - HBeAg pozitívny – 7 vzoriek
 - HBeAg negatívny – 47 vzoriek
- zároveň stanovené HBV DNA metódou PCR
- zároveň vyšetrené ALT
- cieľ:
 1. oboznámiť sa so setom
 2. korelácia s HBV DNA PCR
 3. klinická korelácia

Naše prvé skúsenosti s qHBsAg – práca so setom

- základné on-board riedenie 1:100rozsah merania 5-13000 IU/ml
 - <5 IU/ml ⇒ vyšetrené bez on board riedenia
 - >13000 IU/ml ⇒ manuálne predriedené 1:100
 - ⇒ pokles signálu pod detekčnú úroveň ⇒ predriedené 1:10
- kvantita po riedení 1:10 15 580 – 115 390

hladina v IU/ml	počet	%
<5	8	15
5-13000	29	54
>13000	17	31

Naše prvé skúsenosti s qHBsAg – korelácia s HBV DNA PCR

- „nekoreluje“ 12 vzoriek (22,2 %)
- HBeAg pozitívny – 3 vzorky
- HBeAg negatívny – 9 vzoriek (16,7 %)

č. vzorky	HBeAg	HBV DNA PCR	ALT	qHBsAg
5	negat	negat	v norme	2903
27	negat	negat	v norme	>13000
10	negat	negat	v norme	2690
19	negat	<20	v norme	>13000
22	negat	<20	v norme	1394
23	negat	<20	v norme	>13000
47	negat	<20	v norme	2030
26	negat	<20	v norme	>13000
24	negat	<20	0,85↑	8262

Zhrnutie – možnosti využitia qHBsAg

- nie pri akútnej VHB
- rozlíšenie HBeAg negat. chronickej VHB a inaktívneho nosičstva HBsAg (limitujúca hodnota 1000 IU/ml)
- odlíšenie respondéra a relapséra pri terapii chronickej hepatitídy b
- „stopping-rules“ v 12. resp. 24 týždni terapie



Ďakujem za pozornosť