

WOLFRAM H. GERLICH, DIETER GLEBE, CHRISTIAN G. SCHÜTTLER, WULF R. WILLEMS

# Nationales Konsiliarlabor für Hepatitis B und D in Gießen – Ein Erfahrungsbericht

## Teil II: Okkulte und reaktivierte HBV-Infektionen, Therapieresistenz

*Im vorherigen Heft von Hepatitis&more wurden aus der Tätigkeit des Konsiliarlabors (KL) in Gießen die Bereiche Infektionsketten-Aufklärung, Virussicherheit, Standardisierung und Qualitätskontrolle behandelt. In Teil II geht es um folgende Problemkreise: Gestiegene Sicherheitsstandards bei Blut- und Organspendern sowie bei der Ausübung medizinischer Berufe, die allgemein empfohlene Hepatitis-B-Impfung, die okkulte Hepatitis B sowie Therapieresistenz.*

Gestiegene Sicherheitsstandards bei Blut- und Organspendern sowie bei der Ausübung medizinischer Berufe haben zu einer riesigen Zahl von Screeninguntersuchungen auf bestehende oder durchgemachte HBV-Untersuchungen bei gesunden Personen geführt. Häufig werden dabei positive Befunde erhoben, deren Spezifität und Bedeutung manchmal nur schwer abzuschätzen ist. Die Erkenntnis, dass auch scheinbar „ausgeheilte“ HBV-Infektionen in okkulten Form intrahepatisch weiter bestehen und bei Immunsuppression manchmal mit fatalen Folgen reaktivieren können, stellt Diagnose und Prävention der HBV-Infektion zudem vor völlig neue Probleme, die mit der her-

kömmlichen HBV-Stufendiagnostik und deren Interpretation nicht zu lösen sind. Des Weiteren tauchen im Zusammenhang mit der seit 1995 in Deutschland allgemein empfohlenen Hepatitis-B-Impfung sehr viele Fragen in der Bevölkerung auf, wobei auch hier das Konsiliarlabor (KL) oft zu Rate gezogen wird.

### INTERPRETATION SEROLOGISCHER BEFUNDE

Zum Basiswissen jedes Laboratoriumsmediziners und Internisten gehört die Kenntnis der diagnostischen HBV-Parameter und ihre Interpretation. Es gibt sogar so etwas wie einen serologischen HBV-Rechenschieber. Leider werden die üblichen

Schemata den tatsächlichen Untersuchungsanlässen und Ergebnismustern nicht immer gerecht, so dass viele Fragen offen bleiben.

### ANTI-HBc

Ein häufiges Problem ist ein isolierter anti-HBc-Befund. Manchmal ist ein solcher Befund Folge einer mangelhaften Test-Spe-



Abb. 1:  
Prof. Dr. Wolfram Gerlich  
Leiter des Referenzzentrums  
Hepatitis B und D

zifität, insbesondere wenn das Signal niedrig ist. Der Befund kann jedoch auch Ausdruck einer okkulten HBV-Infektion sein, die z.B. bei Blutspendern zur HBV-Übertragung führen kann (s. Teil I). Ferner besteht die Möglichkeit, dass HBsAg in Wirklichkeit in gut messbaren Mengen vorliegt, wegen Escape-Mutationen mit bestimmten Testkits aber nicht erkannt wird.<sup>1-3</sup> In diesen Fällen ist die Infektion nicht mehr okkult, sondern reaktiviert und mit hoher Virämie (>10<sup>5</sup> HBV-Partikel/ml) verbunden (s. u.).

### REAKTIVIERUNG

Im ungünstigsten Fall kann die Reaktivierung der HBV-Infektion bei zu rascher Immunrekonstitution zur nicht mehr therapierbaren tödlichen Hepatitis führen (<sup>1</sup> und unveröffentlichte Beobachtungen). Die Gefahr der Reaktivierung ist bei der immunsuppressiven Therapie maligner hämatologischer Erkrankungen (z.B. Lymphom oder Knochenmark-Transplantation) besonders hoch.<sup>1-4</sup> Daher stellt selbst eine scheinbar überstandene HBV-Infektion eine potentielle gesundheitliche Beeinträchtigung dar, die im Falle einer Reaktivierung gegebenenfalls als Berufskrankheit gewertet werden kann.<sup>5</sup>

### PROBLEM: ESCAPE-MUTANTEN

Die meisten Fachleute neigen dazu, isolierte anti-HBc-Befunde dann für unspezifisch zu halten, wenn sie mit einem Test-



Abb. 2: Mitarbeiterinnen des KL von links nach rechts: Sibylle Hirzmann, Irmgard Faber-Franek, Karen Leib, Ulrike Birk, Christel Kaiser, Ruth Möller, Renate Klose, Claudia Buhl, Elke Kaiser, Karin Schultheiß

kit eines anderen Herstellers oder anderer Machart nicht reproduziert werden können. Diese Auffassung muss wohl revidiert werden. In einem der interessantesten Fälle des KL wurde die sehr langsame anti-HBc-Serokonversion bei einem erfolgreich geimpften (anti-HBs >1.000 IU/L) Thrombapherese-Spender des Blutspendedienstes Heidelberg untersucht. Als freiwillige Sicherheitsmaßnahme untersuchte dieses Institut schon vor Einführung des obligaten Spenderscreenings alle Spender auf anti-HBc, somit auch in etwa zweiwöchigen Abständen diesen Spender. Drei Jahre nach der Hepatitis-B-Impfung wurde der Spender anti-HBc positiv, obwohl anti-HBs weiterhin hoch positiv war.

Das KL konnte nach Anreicherung mittels Ultrazentrifugation und PCR Spuren von HBV-Escape-Mutanten in den noch vorhandenen Blutplasmen nachweisen. Die Nachuntersuchung aller rückgestellten Spenderproben mit einem empfindlicheren Anti-HBc-Test zeigte, dass der Spender bereits zwei Jahre vorher serokonvertiert und klar positiv war. Überraschenderweise waren alle 23 nachverfolgten suszeptiblen Empfänger der Blutprodukte nicht infiziert. Die HB-Impfung hatte also den Spender nicht vor einer okkulten persistierenden Infektion geschützt, wohl aber vor Krankheit und Infektiosität. In Zusammenarbeit mit dem DRK-Blutspendedienst in Frankfurt konnten noch weitere vier ähnlich gelagerte anti-HBc Serokonversionen beobachtet werden, bei denen der anti-HBc-Befund mit unterschiedlichen Tests divergent ausfiel (M. Schmidt et al., in Vorbereitung). Falsch negative anti-HBc-Befunde wurden außerdem bei einigen perinatal infizierten HBV-Trägern, bei Immunsuppression und in seltenen Fällen auch nach Immunsuppression beobachtet.<sup>2, 4, 6</sup>

### NUR HBsAg POSITIV

Probleme macht auch HBsAg als einziger nachweisbarer HBV-Parameter. Zur Abklärung

der Spezifität kann eine „Neutralisation“ der Reaktion mit anti-HBs versucht werden. Problematisch ist jedoch, dass bei Escape-Mutation diese Neutralisation fehlschlagen kann, obwohl große Mengen an HBV vorliegen (<sup>4</sup> und unveröffentlichte Befunde). Das KL hat einige Antiseren mit besonders breitem Reaktionsspektrum entwickelt, die auch Escape-Mutanten neutralisieren.<sup>2,7</sup> Entscheidend ist hier der Nachweis von HBV-DNA, möglichst mit nachfolgender Sequenzierung der gesamten HBsAg (PreS/S) Genregion.

### HBsAg UND ANTI-HBs POSITIV

Oft wird das KL zur Abklärung bei koexistentem HBsAg und anti-HBs hinzugezogen. Zu diesem Muster kann es bei Reaktivierung einer okkulten HBV-Infektion mit Escape-Mutanten kommen.<sup>1-3</sup> Sehr oft hat das Virus (und somit auch das HBsAg) aber die Wildtyp-Sequenz. Das KL verfügt über eine Sammlung von HBsAg-Präparaten verschiedener Genotypen, mit denen die Spezifität des anti-HBs gemessen wird. Praktisch immer reagiert anti-HBs in diesen Fällen nicht mit seinem eigenen HBV-Genotyp, sondern nur mit einigen, meist nicht allen, heterologen Genotypen.<sup>8</sup> Diese Antikörper unterdrücken die Vermehrung des eigenen Virus nur geringfügig, können aber andere HBV-Genotypen neutralisieren (D. Glebe unveröffentlicht). In der Tat sind bei HBV, im Gegensatz zu HCV und HIV, Koinfektionen mit mehreren Genotypen selten.

### IMPfstoff-INDUZIERTER ANTIKÖRPER

Insgesamt zeigen die Erfahrungen des KLs, dass natürliche anti-HBs-Antikörper gut gegen das eigene okkulte Virus schützen, und Impfstoff-induzierte anti-HBs-Antikörper gegen HBV-Wildtypen. Bei Immunsuppression können sich jedoch Escape-Mutanten auch in Gegenwart von anti-HBs stark vermehren. Während bei Impfstoff-induziertem anti-HBs meist schon eine oder zwei Mutationen in der HBsAg-Schleife (Aminosäure 100-170 des



Abb. 3: Dr. Wulf R. Willems, Ärztlicher Leiter des KL bei telefonischer Beratung

kleinen S-Proteins) genügen, fanden wir bei natürlich induziertem anti-HBs bis zu 24 Mutationen im reaktivierten Virus. Demgegenüber war in diesen Fällen die essentielle PräS1-Anheftungsstelle an den HBV-Hüllproteinen gar nicht oder nur minimal verändert. Antikörper gegen diese Stelle neutralisieren HBV sehr wirksam.<sup>9</sup> PräS1-Epitope sind in einigen, leider wenig verbreiteten, Hepatitis-B-Impfstoffen enthalten und könnten mutmaßlich das Problem der Nonresponder und des Immunescape verringern. Das KL plant die Schutzwirkung von HB-Impfstoffen mit und ohne PräS in vitro und im Feld zu vergleichen.

### HBV-RESISTENZ

Bei der Interferontherapie ist in den letzten Jahren erkannt worden, dass die Genotypen A und B besser, die Genotypen C und D dagegen schlechter ansprechen. Da Interferon in einigen Fällen eine bleibende Heilung bewirkt, gilt es bei vielen Klinikern noch als Mittel der ersten Wahl. Man sollte jedoch bevorzugt Patienten mit den günstigeren Genotypen behandeln. Bei der Nukleotid- und Nukleosid-Therapie zeigte sich, dass in der klinischen Anwendung ein primäres und resistenzbedingtes Therapieversagen häufiger ist, als die ersten optimistischen Veröffentlichungen erwarten ließen. Es kommt nicht selten zur Selektion von resistenten HBV-Mutanten. Bei diesem Problem konnte das KL in mehrfacher Weise behilflich sein. >

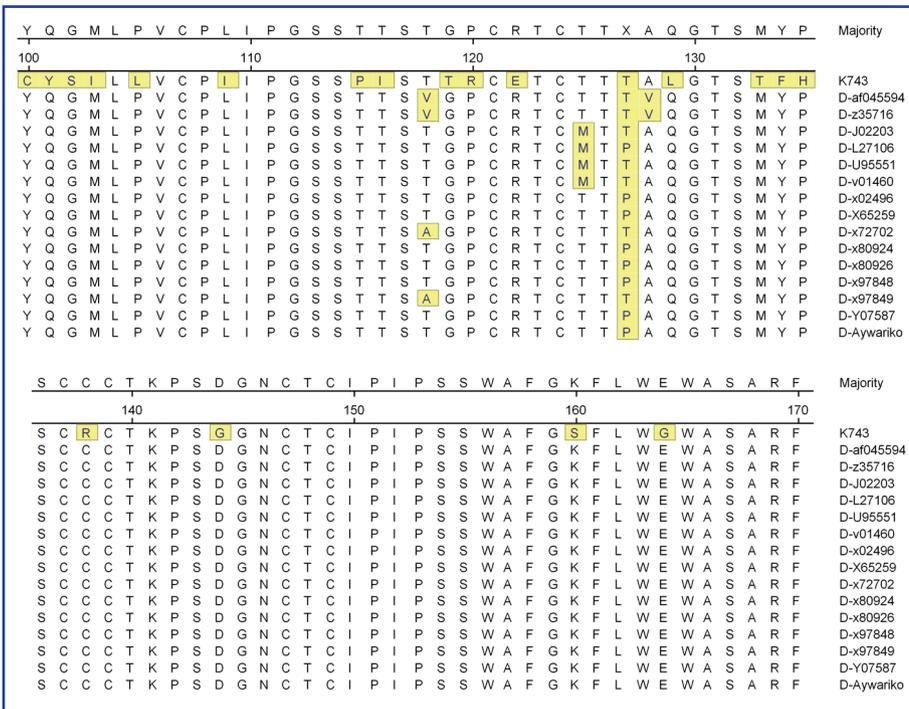


Abb. 4: Mutierte Positionen (gelb) in der Aminosäuresequenz der HBsAg-Schleife Aminosäure 100 bis 170 des S-HBs-Proteins) bei einem Patienten mit reaktivierter akuter Hepatitis B (ALT 2000 IU/L) nach immunsuppressiver Lymphomtherapie (1. Zeile, K743) im Vergleich zu 15 Wildtyp-Sequenzen des HBV-Genotyps D. Unabhängig von der üblichen Variabilität bei den Positionen 118, 125, 127 und 128 werden 19 Mutationen zwischen Aminosäure 99-179 gefunden, insbesondere im Bereich der Determinante a zwischen Aminosäure 119 bis 147, aber auch ausserhalb. Vor der Therapie hatte der Patient anti-HBs und anti-HBc, danach nur noch anti-HBc und 10<sup>5</sup> GE/ml HBV DNA. Der HBsAg-Test war negativ. Offensichtlich hat das anti-HBs zur Selektion stark mutierter HBV Varianten geführt. Weitere 9 Mutationen gab es im restlichen S-HBs-Protein des Patienten, während die 15 anderen Sequenzen insgesamt nur 3 individuelle Mutationen ausserhalb der variablen Stellen aufwiesen.

### HBV-SEQUENZIERUNG

Sowohl der Genotyp als auch Resistenzmutationen und die oben erwähnten Escape-Mutationen können durch eine Sequenzierung des PCR-Produkts aus der S/RT Region des HBV-Genoms in einem Zug erfasst werden. Normalerweise genügt die Direktsequenzierung, mitunter ist jedoch die aufwändigere Klonierung des DNA-Fragments angebracht mit nachfolgender Sequenzierung von bis zu 20 Klonen.

Diese Technik erlaubt eine wesentlich bessere Erfassung von relevanten Mutationen als die kommerziell erhältlichen Hybridisierungssysteme, ohne teuer zu sein. Unter anderem wurde eine neue HBV-Variante mit erhöhter Resistenz gegen Adefovir gefunden.<sup>10</sup>

Nicht selten wurden bei scheinbaren oder tatsächlichem Therapieversagen keine bekannten Resistenzmutationen gefunden, was auf fehlende Compliance oder pharmakologische Ursachen hinweist.<sup>11</sup> Neben der S/RT-Region ist auch die X/Core-Promoter und die Precore/Core-Region von Interesse, da sich hier die Mutationen mit Erhöhung der Pathogenität finden.<sup>1</sup> Daneben werden auch Amplifikationen und Klonierungen des gesamten HBV-Genoms durchgeführt, z.B. kürzlich in einem Fall von Hepatitis B Immunglobulin-Dauertherapie, wo 10 Jahre nach einer Lebertransplantation das Virus des Patienten überraschend in stark mutierter Form als sehr heterogene Quasispezies reaktivierte.

### BERATUNG UND UNTERSUCHUNGSSPEKTRUM

Jeder, der ein Problem mit HBV oder HDV hat, das nicht im Rahmen normaler medizinischer Abläufe gelöst werden kann, ist eingeladen, sich an das KL zu wenden. Stark in Anspruch genommen wird die Beratung mittels Telefonaten oder auf schriftliche Anfragen. Neben Labormedizinern, Mikrobiologen/Virologen und Hygienikern sind es oft auch Ärzte unterschiedlicher Fachrichtungen, die mit unerwarteten HBV-Problemen konfrontiert sind. Hinzu kommen Patienten und deren Angehörige, die sich von ihrem behandelnden Arzt nicht ausreichend informiert fühlten. Darüber hinaus steht das KL für Gutachten zur Verfügung. ■

Prof. Dr. Wolfram Gerlich · Institut für Med. Virologie  
Frankfurter Straße 107 · 35392 Gießen  
E-Mail: Wolfram.H.Gerlich@viro.med.uni-giessen.de

**Danksagung.** Die Arbeiten des Instituts für Medizinische Virologie wurden von der EU, der DFG, der WHO und dem Paul Ehrlich-Institut unterstützt. Wir danken Frau U. Wend für die excellenten molekularbiologischen HBV-Analysen und allen KollegInnen, die sich mit interessanten Fällen an uns gewandt haben, für die vertrauensvolle Zusammenarbeit.

### Literatur

- Westhoff TH, Jochimsen F, Schmittl A, Stöffler-Meilicke M, Schäfer JH, Zidek W, Gerlich WH, Thiel, E. Fatal hepatitis B virus reactivation by an escape mutant following rituximab therapy. *Blood*. 2003 Sep 1;102(5):1930.
- Awierkiew S, Däumer M, Reiser M, Wend UC, Pfister H, Kaiser R, Willems WR, Gerlich WH. Reactivation of an occult hepatitis B virus escape mutant in an anti-HBs positive, anti-HBc negative lymphoma patient. *J Clin Virol*. 2007, 38: 83-86.
- Gerlich WH. Breakthrough of hepatitis B virus escape mutants after vaccination and virus reactivation. *J Clin Virol*. 2006, 36 Suppl. 1: S18-22.
- Gärtner BC, Jung W, Welsch C, Fischinger JS, Zeuzem S, Müller-Lantsch N, Wend UC, Gerlich WH. Permanent loss of anti-HBc after reactivation of hepatitis B virus infection in an anti-HBs and anti-HBc-positive patient after allogeneic stem cell transplantation. *J Clin Virol*. 2007, 38:146-148.
- Gerlich WH, Schüttler CG. Vermeintlich überstandene Hepatitis-B-Virusinfektion – mögliche Probleme. In: H. Selmair, M.P. Manns Virushepatitis als Berufskrankheit, ecomed Verlag, Landsberg, 2007, S. 128-137.
- Gerlich WH, Glebe D, Schüttler CG. Deficiencies in the standardization and sensitivity of diagnostic tests for hepatitis B virus. *J Viral Hepatitis*. 2007, 14(Suppl.1):
- Gerlich WH, Wend U, Glebe D. Quantitative assay of hepatitis B surface antigen in serum or plasma using Laurell electrophoresis. In: Lau, J., Hamatake, R.: Hepatitis B Virus protocols book, p. 57-63, Humana press, Totowa, N.J. 2004.
- Gerlich WH. The enigma of concurrent hepatitis B surface antigen (HBsAg) and antibodies to HBsAg. *Clin Infect Dis*. 2007, 44: 1170-2.
- Glebe D, Aliakbari M, Krass P, Knoop E, Valerius KP, Gerlich WH. PreS1 antigen dependent infection of Tupaia hepatocyte cultures with human hepatitis B Virus. *J Virol*. 2003, 77:9511-21.
- Schildgen O, Sirma H, Funk A, Olotu C, Wend UC, Hartmann H, Helm M, Rockstroh JK, Willems WR, Will H, Gerlich WH. Variant of hepatitis B virus with Primary Resistance to Adefovir. *New Engl J Med*. 2006, 354: 1807-1812.
- Schildgen O, Helm M, Gerlich WH. Nonresponse to Adefovir: Host or Virus dependent? *J Clin Virol*. 2006, 37: 327-328.

## Untersuchungen am Konsiliarlabor

Oft erfordert eine sinnvolle Beratung die eingehende Untersuchung von Patientenproben. Unser Untersuchungsprogramm ist unten aufgeführt. Da das KL aber keine Mittel für seine Tätigkeit erhält, können Proben nur dann ohne Berechnung untersucht werden, wenn ein besonderes Forschungsinteresse unsererseits besteht. Eine Ermächtigung zur kassenärztlichen Abrechnung unserer Spezialuntersuchungen ist beantragt, bislang jedoch abgelehnt worden. Das KL für HBV und HDV ist am ersten privatisierten Universitätsklinikum Deutschlands angesiedelt, bleibt aber als Institut des Fachbereichs Medizin der Universität Gießen zugleich für Forschung und Lehre eine Einrichtung des Landes Hessen. Bislang hat diese Konstruktion für die Virologie in Gießen neue positive Impulse gegeben.

Institut für Med. Virologie · Frankfurter Straße 107 · 35392 Giessen · Tel. 0 641 / 99-41201 · Fax 0 641 / 99-41209

## Leistungsübersicht des KL für Hepatitis B und D

### Beratung

- Interpretation unklarer Labor-Befunde, Vorschläge zur weiteren Klärung
- Interpretation unerwarteter klinischer Verläufe
- Beurteilung der Infektiosität von Virusträgern
- Beurteilung der Immunitätslage vor und nach Impfung

### Untersuchungsspektrum

- Quantitative Bestimmung der HBV-DNA mit geeichter real-time PCR,
  - bei Bedarf nach Anreicherung
- Sequenzierung relevanter Genombereiche
  - Genotyp, HBsAg Subtyp
  - Anti-HBs-Escape-Mutationen
  - Resistenzmutationen gegen Inhibitoren der HBV-DNA-Polymerase
  - Pathogenitätsvarianten (HBeAg-minus-, Promoter-Mutanten, etc.)
  - Infektionskettenaufklärung
- Spezifitätsüberprüfung serologischer Befunde mit Spezialreagenzien
  - HBsAg
  - Anti-HBs
  - Anti-HBc
- Nach Absprache Messung neutralisierender HBV-Antikörper
- Quantitative real-time RT/PCR der HDV-RNA, bei Bedarf Sequenzierung des Produkts

### Referenzpräparate

- quantitative HBV-DNA-Standards Genotypen A-G, geeicht gemäß WHO
- quantitativer HBsAg-Standard, geeicht gemäß WHO
- gereinigtes HBsAg aus Virusträgerplasma
- gereinigtes HBV aus Virusträgerplasma
- monoklonale und polyvalente HBV-Antikörper

### Gutachten

- HBV-Sicherheit medizinischer Präparate und Therapien
- Infektionskettenaufklärung
- Infektiosität von Virusträgern
- HBV-Inaktivierung bzw. Desinfektion