

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

“ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΛΟΙΜΩΞΙΟΛΟΓΙΑ”

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

"ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΑΝΤΙ – HBc

IgM ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ Β"

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ: ΓΙΑΝΝΟΥΛΑ ΜΕΛΙΝΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΠΑΠΑΕΥΑΓΓΕΛΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ,

Καθηγήτρια Παιδιατρικής – Λοιμωξιολογίας,

Διευδύντρια Γ' Παιδιατρικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών,

Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2019

**MASTER OF SCIENCE (M.Sc.) DEGREE IN "PEDIATRIC
INFECTIONS"**

**NATIONAL AND KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS
MEDICAL SCHOOL**

POSTGRADUATE THESIS

**“EVALUATION OF ANTI – Hbc IgM QUANTIFICATION IN PATIENTS
WITH CHRONIC HEPATITIS B”**

POSTGRADUATE STUDENT: GIANNOULA MELINA

SUPERVISING MENTOR: PAPAEVAGGELOU VASILIKI

Professor of Pediatrics and Infectious diseases,
3rd Pediatric Department of University of Athens,
General University Hospital "Attikon"

ATHENS

JUNE 2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ANTI- HBc IgM ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΧΡΟΝΙΑ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ Β

Εισαγωγή:

Αρχικά η μέτρηση των IgM αντισωμάτων έναντι του αντιγόνου core της ηπατίτιδας Β (HBc) γινόταν με ημιποσοτικές μεθόδους ΜΕΙΑ και έδινε τη δυνατότητα συσχέτισης της τιμής index anti – HBc IgM με ενεργότητα της ηπατικής νόσου σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β (CHB). Σήμερα, έχει αντικατασταθεί από μεθόδους χημειοφωταύγειας, οι οποίες είναι αποκλειστικά ποιοτικές.

Σκοπός:

Η αξιολόγηση μίας νέας ποσοτικής δοκιμασίας ELISA και η διερεύνηση χρήσης των επιπέδων anti – HBc IgM, ως ικανό βιοδείκτη ενεργότητας CHB νόσου.

Μέθοδοι:

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος HBcIgM (DIA.PRO, Italy), χειροκίνητη ELISA σε ορό 344 ασθενών με CHB. Το όριο ανίχνευσης είναι οι 5 U / mL (index: 0.500) ενώ όριο θετικότητας οι 12 U / ml (index

1.200). Επιχειρήθηκε συσχέτιση του ανιχνεύσιμου αντι - HBc IgM index με ενεργοποίηση του HBV και καθορισμός ενός κλινικά σημαντικού ορίου.

Αποτελέσματα:

Από τα 344 δείγματα τα **39** βρέθηκαν με αντι - HBc IgM $> 5 \text{ U / mL}$ (**11.3%**). Παρατηρήθηκε συσχέτιση της τιμής index $> 0,500$ με παθολογικές τιμές ($> 40 \text{ IU / L}$) ALT και AST (p-value **0.007** και **0.018** αντίστοιχα). Στις καμπύλες ROC για τα δύο ζεύγη μεταβλητών, τα εμβαδά κάτω από την καμπύλη (AOC) ήταν **0.798** και **0.776** αντίστοιχα. Βρέθηκε ότι το όριο (cutoff) με τον καλύτερο συνδυασμό ευαισθησίας και ειδικότητας (**83.3%** και **77.8%** για την ALT και **82.8%** και **75%** για την AST), είναι το **0.678** (ή **6.8 U / mL**).

Συμπέρασμα:

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των anti – HBc IgM είναι χρήσιμος βιοδείκτης παρακολούθησης στη CHB. Προτείνουμε ότι επίπεδα $> 6,8 \text{ U / mL}$ σχετίζονται με έξαρση ηπατικής νόσου.

Λέξεις - κλειδιά:

αντι – HBc IgM, ποσοτική ELISA, χρόνια ηπατίτιδα B.

THESIS ABSTRACT

EVALUATION OF ANTI- HBc IgM QUANTIFICATION IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B

Introduction:

The semi – quantitative MEIA assays that have previously successfully correlated HBc – anti – IgM index and hepatic flares in CHB patients are no longer available, while currently used chemiluminescence assays are qualitative methods only.

Aim of study:

The evaluation of a quantitative anti – HBc IgM ELISA assay as a tool for monitoring CHB for acute exacerbations.

Methods:

344 CHB patients' sera were tested with a non – automated quantitative HBcIgM (DIA.PRO, Italy), ELISA assay. The limit of detection is 5 U / mL (index: 0.500), while samples with values $\geq$ 12 U / mL (index 1.200) are positive. Index values were checked for correlations with acute exacerbations of CHB and a cutoff value was estimated.

Results:

Overall, 39 / 344 (11.3%) patients had antibody concentrations higher than 5 U / mL. Index values $> 0,500$ were correlated with abnormal (> 40 U / L) ALT και AST values (p-value = **0.007** και **0.018** accordingly). When ROC curves for both pairs (index – ALT and index - AST) were used, the AOCs were **0.798** και **0.776**. Using the ROC we were able to identify an optimal index cutoff of **0.678** (or 6.8 U / mL) for the detection of chronic hepatitis flair (ALT sensitivity 83.3% - specificity **77.8%**, AST sensitivity **82.8%** - specificity **75%**).

Conclusion:

The quantification of HBc – anti – IgM using an ELISA assay is a useful diagnostic tool for long – term monitoring CHB patients and identifying hepatic flares. We propose the use of an index value of > 0.678 (or 6.8 U / mL) for the detection of disease exacerbation.

Keywords:

HBc – anti – IgM, quantitative ELISA, CHB, exacerbations, transaminases.

Η εργασία αυτή είναι αφιερωμένη στον Άκη, του οποίου η υπομονή και η κατανόηση είναι αντιστρόφως ανάλογες με την ηλικία του...

Ευχαριστίες

Για τη μεγάλη συνεισφορά της στην πραγματοποίηση αυτής της Διπλωματικής Εργασίας θα ήθελα καταρχάς να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα Καθηγήτρια και μέντορά μου, κ. Παπαευαγγέλου Βασιλική. Πάνω από όλα, ευχαριστώ για την άριστη επικοινωνία, τα ταχύτατα αντανακλαστικά στην επίλυση προβλημάτων, τη μεγάλη κατανόηση και τη διδακτική μεταδοτικότητα.

Επίσης, ευχαριστώ τη Συντονιστική Επιτροπή του Μεταπτυχιακού προγράμματος, τη Γραμματεία και γενικά όλους όσους συνεισέφεραν στην οργάνωση, προγραμματισμό και εκτέλεση αυτού του εκπαιδευτικού πονήματος με μεγάλο, μεταδοτικό ενθουσιασμό.

Τέλος, χρωστάω μεγάλη ευγνωμοσύνη στην κ. Χατζηγιάννη Αιμιλία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών και Υπεύδυνη του Εργαστηρίου της Β' Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Χωρίς την πολύτιμη βοήθειά της, η εκπόνηση αυτής της Διπλωματικής Εργασίας θα ήταν αδύνατη. Με δική της πρωτοβουλία, μάλιστα, η εργασία παρουσιάστηκε στο 5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιολογίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. 1. Επιδημιολογικά στοιχεία για τον ιό της ηπατίτιδας Β
1. 2. Δομή και γονότυποι του HBV
1. 3. Κύκλος ζωής του ιού
1. 4. Ορολογική διάγνωση του HBV
1. 5. Μοριακές μέθοδοι διάγνωσης
1. 6. Φυσική πορεία της HBV λοίμωξης
1. 7. Οξεία επιδείνωση ηπατικής νόσου
1. 8. Διαφορική διάγνωση οξείας ηπατίτιδας Β από έξαρση νόσου σε χρόνια ηπατίτιδα Β.
1. 9. Δοκιμασίες για την ανίχνευση η anti – HBc IgM
 1. 9. 1. Ανοσοενζυμική δοκιμασία μικροσωματιδίων
 1. 9. 2. Μέθοδος χημειοφωταύγειας
 1. 9. 3. Σύγκριση των παραπάνω μεθόδων
 1. 9. 4. Η ποσοτική ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA

2. ΚΥΡΙΟ ΜΕΡΟΣ

2. 1. Μεθοδολογία
 2. 1. 1. Σκοπός της μελέτης
 2. 1. 2. Πληθυσμός και σχεδιασμός της μελέτης
 2. 1. 3. Εργαστηριακή μεθοδολογία
 2. 1. 4. Στατιστική ανάλυση
2. 2. Αποτελέσματα

3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. 1. Επιδημιολογικά στοιχεία για τον ιό της ηπατίτιδας Β (Hepatitis B Virus ή HBV)

Η χρόνια λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας Β αποτελεί ένα μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας παγκοσμίως, αφού υπολογίζεται ότι 25% αναπτύσσει κίρρωση ή και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ). Εκτιμάται ότι 2 δισεκατομμύρια άνθρωποι έχουν προσβληθεί από τον ιό, ενώ οι χρόνιοι φορείς, οι οποίοι βρίσκονται σε κίνδυνο να αναπτύξουν ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και κίρρωση, υπολογίζονται σε 257 εκατομμύρια συνολικά. Εκφρασμένος σε ποσοστά, ο αριθμός των χρόνιων φορέων είναι ισοδύναμος με το 3.5% του παγκόσμιου πληθυσμού, ενώ το 68% αυτών εντοπίζεται στην Αφρικανική Ήπειρο και στο Δυτικό Ειρηνικό. ⁽¹⁾

Ανάλογα με τον επιπολασμό των χρόνιων φορέων του ιού της ηπατίτιδας Β σε όλο τον κόσμο, διακρίνονται περιοχές με υψηλή ενδημικότητα (όπου $\geq 8\%$ του πληθυσμού φέρει το επιφανειακό αντιγόνο του ιού), ενδιάμεση ενδημικότητα (όπου το παραπάνω ποσοστό αφορά στο 2 – 8% του πληθυσμού) και χαμηλή ενδημικότητα (όπου λιγότεροι από 2% του πληθυσμού ανήκουν στους χρόνιους φορείς). Η Ελλάδα ανήκει στις περιοχές ενδιάμεσης ενδημικότητας, με επιπολασμό που υπολογίζεται σε 2.5 – 3% των διαμενόντων στη χώρα. ⁽²⁾

Ο ιός της ηπατίτιδας Β μπορεί να μεταδοθεί είτε διαδερμικά (σε χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών, μεταμοσχευθέντες / μεταγγισθέντες και επαγγελματίες υγείας), είτε μέσω των βλεννογόνων (περιγεννητικά,

ενδοοικογενειακά ή, τέλος, κατά τη σεξουαλική επαφή). ⁽³⁾ Είναι γνωστό ότι το φορτίο της νόσου προκύπτει κατά κύριο λόγο από λοίμωξη πριν την ηλικία των 5 ετών και, πιο συγκεκριμένα, αφορά κυρίως σε βρέφη μητέρων που νοσούσαν από ηπατίτιδα Β και τους μεταδόθηκε ο ιός περιγεννητικά. Αν λοιπόν ληφθεί υπόψη ότι οι γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας αποτελούν το 25.3% του πληθυσμού της Γης, υπολογίζεται ότι 65 εκατομμύρια γυναίκες που νοσούν από ηπατίτιδα Β μπορούν δυνητικά να μεταδώσουν τον ιό στα βρέφη τους, αν δεν εφαρμοστούν μέτρα παρέμβασης. ⁽¹⁾

Τα μέτρα αυτά συνίστανται στον προγεννητικό έλεγχο των εγκύων, τη χορήγηση ανοσοπροφύλαξης (με τη μορφή της υπερανόσου γ σφαιρίνης και της πρώτης δόσης του εμβολίου μέσα στο πρώτο 24ωρο από τον τοκετό) στα βρέφη των μητέρων που νοσούν και την ολοκλήρωση του εμβολιαστικού σχήματος τους πρώτους 6 μήνες ζωής. ⁽⁴⁾ Πράγματι, οι πρακτικές αυτές φαίνεται να έχουν αποδώσει καρπούς: Η παγκόσμια εμβολιαστική κάλυψη υπολογίζεται σε 84%, ενώ ο επιπολασμός της λοίμωξης από ηπατίτιδα Β κατά τα πρώτα 5 έτη της ζωής εκτιμάται σε 1.3%, ποσοστό εντυπωσιακά μειωμένο σε σχέση με το αντίστοιχο 4.7% που σημειωνόταν πριν την ευρεία εφαρμογή εμβολιαστικών προγραμμάτων. ⁽¹⁾

Εντούτοις, οι στόχοι που έχουν τεθεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π. Ο. Υ) σε σχέση με την μείωση της νοσηρότητας δεν έχουν ακόμη επιτευχθεί, ειδικά στις χώρες με υψηλή ενδημικότητα της νόσου.

Τα αντίστοιχα επιδημιολογικά δεδομένα σε σχέση με τη θνητότητα από ηπατίτιδα Β αντικατοπτρίζουν πλήρως της σοβαρότητα του νοσήματος. Το 2015, σημειώθηκαν 1.34 εκατομμύρια θάνατοι συνολικά από ιογενείς ηπατίτιδες, οριακά λιγότεροι των θανάτων από φυματίωση (1.37 εκατομμύρια) και σημαντικά περισσότεροι από τους

θανάτους λόγω HIV και ελονοσίας (1.06 εκατομμύρια και 0.44 εκατομμύρια αντίστοιχα). Η ηπατίτιδα Β συγκεκριμένα ευδύνεται τουλάχιστον για το 66% αυτών θανάτων (δηλαδή για περισσότερους από 884.000 θανάτους το χρόνο). Σε αντίθεση, όμως, με τις υπόλοιπες προαναφερθείσες νόσους, η θνητότητα από τις οποίες παρουσιάζει πτωτική τάση, οι θάνατοι από ηπατίτιδα Β ειδικά και από τις ιογενείς ηπατίτιδας εν γένει φαίνεται να αυξάνονται και συγκεκριμένα κατά 22% από την προηγούμενη έκδοση του Π. Ο. Υ. το 2000. ⁽¹⁾

Ακόμη πιο ανησυχητική είναι η πρόβλεψη που διατυπώνεται στην έκδοση του 2015 ότι η θνησιμότητα θα αυξηθεί περαιτέρω, καθώς εκείνοι που έχουν μολυνθεί από τον ιό πριν από την ευρεία εφαρμογή εμβολιαστικών προγραμμάτων τη δεκαετία του 1990, αναμένεται να εμφανίσουν τις θανατηφόρες επιπλοκές της νόσου (κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα) μέσα στα επόμενα χρόνια. Το 93% των θανάτων από τη νόσο επέρχεται μετά από την ηλικία των 30 ετών, ενώ η δυσμενής αυτή έκβαση παρατηρείται συχνότερα στους άνδρες και στους διαμένοντες σε περιοχές με υψηλό επιπολασμό, γιατί προφανώς συσχετίζεται με το χαμηλότερο βιοτικό επίπεδο που παρατηρείται εκεί, καθώς και τη δυσκολότερη πρόσβαση στη θεραπεία.

Όλα τα παραπάνω καταδεικνύουν την επικινδυνότητα της νόσου και τη σημασία συντονισμένης στρατηγικής σε παγκόσμια κλίμακα για την αντιμετώπισή της. Οι προτεινόμενοι πυλώνες δράσης είναι η πρόληψη της μετάδοσης, η πιο έγκαιρη διάγνωση και η ευκολότερη πρόσβαση στη θεραπεία, όπου αυτή συνίσταται.

1. 2. Δομή και γονότυποι του HBV

Ο DNA - ιός της ηπατίτιδας B (Hepatitis B Virus ή HBV) ανήκει στην οικογένεια των *Hepadnaviridae*. Το ιϊκό σωματίο, το οποίο έχει διάμετρο 30 – 42 nm, ονομάζεται σωματίο Dane (βίριο). Αποτελείται εξωτερικά από ένα λιπιδικό φάκελο (περίβλημα), ο οποίος περιέχει το γλυκοπρωτεϊνικό αντιγόνο επιφανείας HBsAg (παλαιότερα καλούμενο *Αυστραλιανό αντιγόνο*) και εσωτερικά από ένα εικοσαεδρικό πρωτεϊνικό καψίδιο. Το καψίδιο περιέχει το γενετικό υλικό του ιού (ένα μικρό, κυκλικό, εν μέρει δίκλωνο μόριο DNA με 3200 βάσεις) και μια πρωτεϊνική κινάση και DNA πολυμεράση με δραστικότητα αντίστροφης μεταγραφάσης (βλ. Σχήμα 1, Παράρτημα).

Τα παραπάνω ένζυμα περιβάλλονται από το πυρηνικό αντιγόνο του HBV ή HBcAg, ενώ στενά συνδεδεμένο με το νουκλεοκαψίδιο είναι το αντιγόνο e του ιού ή HBeAg, το οποίο επίσης κυκλοφορεί ως διαλυτή πρωτεΐνη στον ορό. Άλλες μορφές του ιού αποτελούν μικρά σφαιρίδια με διάμετρο ως 20 nm, τα οποία περιέχουν αντιγόνο επιφανείας HBsAg αλλά στερούνται γενετικού υλικού, αλλά και επιμήκεις σωληνοειδείς δομές ⁽⁴⁾.

Έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα τουλάχιστον δέκα γενετικές ποικιλίες του HBV ή αλλιώς γονότυποι, των οποίων η γονιδιακή σύσταση έχει σταθεροποιηθεί μακροχρόνια στη φύση, παρέχοντας στα αντίστοιχα στελέχη πλεονεκτήματα επιβίωσης ή και πολλαπλασιασμού. Οι γονότυποι διαφέρουν σε ποσοστό μεγαλύτερο του 8% στη νουκλεοτιδική αλληλουχία ολόκληρου του γονιδιώματος, ή σε περισσότερο από 4% στην ανάλυση της συντηρημένης περιοχής. Συμβολίζονται με τα λατινικά γράμματα A – J, ενώ περιγράφονται και υπογονότυποι για όλες τις ποικιλίες εκτός από τις E, G, H, I και J. Πιο συγκεκριμένα υπάρχουν 2 υπογονότυποι για τους γονοτύπους A και F

(A1 – A2 και F1 – F2 αντίστοιχα) και 4 για τις υπόλοιπες ομάδες (B1, B2, B3, B4 και ομοίως για τις C και D).

Κάθε γονότυπος έχει συγκεκριμένη γεωγραφική κατανομή, τείνει δηλαδή να απαντάται σε διαφορετικές περιοχές ανά την υφήλιο. Για παράδειγμα, ο γονότυπος A επικρατεί στη Βορειοδυτική Ευρώπη και τη Βόρεια και Νότια Αφρική, ενώ οι γονότυποι B και C στην Ασία (εκτός της Μέσης Ανατολής) και την Ωκεανία. Από την άλλη, ο γονότυπος D είναι ο συνηθέστερα απαντώμενος στη χώρα μας και γενικά στη λεκάνη της Μεσογείου και τη Μέση Ανατολή, χωρίς ωστόσο να περιορίζεται η κατανομή του στις περιοχές αυτές. Στην υπόλοιπη Αφρική (Δυτική και Κεντρική) συναντάται ο E γονότυπος, στην Κεντρική Αμερική οι F και H (ο πρώτος και στη Νότια Αμερική) ενώ ο G είναι πιο κοινός στη Γαλλία και στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής. ⁽³⁾ Οι δυο τελευταίοι γονότυποι I και J περιγράφηκαν και πιο πρόσφατα, με τον πρώτο να εντοπίζεται στο Βιετνάμ, το Λάος, την Ινδία και την Κίνα, ενώ το δεύτερο στην Ιαπωνία. ⁽⁵⁾

Όπως σε κάθε παθογόνο, έτσι και στον HBV το φαινόμενο των μεταλλάξεων επιτείνει τη λοιμογονικότητα και την ανθεκτικότητα. Ειδικά για τον ιό της ηπατίτιδας B, παρατηρείται η εμφάνιση προπυρηνικά μεταλλαγμένων στελεχών. Πρόκειται για βιώσιμα στελέχη του ιού, τα οποία ανιχνεύονται στις πρώιμες φάσεις της λοίμωξης, αλλά είναι υπολειμματικά ως προς την παραγωγή του αντιγόνου e. Δεδομένου ότι το ανοσοποιητικό σύστημα στρέφεται εναντίον του e αντιγόνου κατά την έναρξη της ανοσιακής αντίδρασης, εκείνα τα στελέχη που στερούνται e, ευνοούνται λόγω φυσικής επιλογής και καταλήγουν να επικρατούν σε επόμενες φάσεις της νόσου.

Τα παραπάνω στελέχη παρατηρούνται συχνά στον ορότυπο D που είναι και ο πιο συνήθης στην Ελλάδα. Πιο συγκεκριμένα, η συχνότερη μετάλλαξη είναι η υποκατάσταση βάσης γουανίνης από αδερίνη (στο προτελευταίο κωδικόνιο του προ – C γονιδίου) στο νουκλεοτίδιο 1896, με τελικό αποτέλεσμα την αναστολή της μετάφρασης του HBeAg. Η κλινική σημασία αυτής της μετάλλαξης είναι μεγάλη, καθώς σχετίζεται με βαρύτερη νόσο, βραδύτερη κάθαρση του ιού και πτωχότερη ανταπόκριση στη θεραπεία. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί με αυξημένη συχνότητα σε ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.

1. 3. Κύκλος ζωής του ιού (βλ. Σχήμα 2, Παράρτημα)

Η αντιγραφή του HBV είναι ξεχωριστή για δύο λόγους: Πρώτον, ο ιός έχει σαφή τροπισμό προς το ήπαρ. Δεύτερον, αναπαράγεται μέσω ενός ενδιάμεσου RNA και παράγει και απελευθερώνει παραπλανητικά σωματίδια (HBsAg).

Για την προσκόλληση στο ηπατοκύτταρο έχουν προταθεί διάφοροι πιθανοί υποδοχείς, όπως η ηπατική ανεξίνη ή ο υποδοχέας της τρανσφερρίνης, αλλά ο ακριβής μηχανισμός εισόδου δεν είναι γνωστός. Φαίνεται, πάντως, ότι ο ιός συνδέεται με τη λευκωματίνη και άλλες πρωτεΐνες του ορού, άρα διευκολύνεται η πρόσληψη από το ήπαρ ⁽⁴⁾.

Το ιϊκό σωματίο (βίριο) εισέρχεται στο ηπατοκύτταρο με ενδοκυττάρωση, αποβάλλει το περίβλημά του και μετακινείται προς τον πυρήνα. Εκεί, το γονιδίωμα του ιού ελευθερώνεται, οργανώνεται σε νουκλεοσώματα για να ωριμάσει και σχηματίζεται το μικροχρωμόσωμα του ιού. Το γενετικό υλικό δεν έχει πλέον τη μορφή του κυκλικού μερικώς δίκλωνου DNA, όπως στο καψίδιο, αλλά υφίσταται ως "κυκλικό ομοιοπολικά κλειστό" (covalently closed circular DNA ή cccDNA) . Το cccDNA λειτουργεί ως εκμαγείο (template) για τη μεταγραφή του ιού χρησιμοποιώντας την RNA πολυμεράση και καθορίζει τουλάχιστον 4 πλαίσια μεταγραφής: Ένα προγενωμικό RNA και τρία υπογενωμικά mRNA. Το πρώτο προάγει τον πολλαπλασιασμό του ιού και το σχηματισμό του HBsAg, του HBeAg και της πολυμεράσης, ενώ τα δεύτερα συμμετέχουν στη σύνδεση των πρωτεϊνών του περιβλήματος.

Αφού παραχθεί το προγενωμικό RNA, εγκαταλείπει τον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα σχηματίζεται το νουκλεοκαψίδιο του ιού. Κατόπιν, μεταγράφεται ανάστροφα σε κυκλικό μερικώς δίκλωνο DNA. Στη συνέχεια, τα νουκλεοκαψίδια αποκτούν τις μεμβράνες του

περιβλήματός τους περνώντας από το ενδοπλασματικό δίκτυο και εξέρχονται από το κύτταρο με εξωκύττωση και όχι με λύση.

Επομένως, τα ενδοκυττάρια νουκλεοκαψίδια μπορούν να ακολουθήσουν δύο πιθανές οδούς, είτε προς τον πυρήνα, είτε προς το ενδοπλασματικό δίκτυο. Στα αρχικά στάδια της λοίμωξης, όταν τα διαθέσιμα περιβλήματα είναι ακόμη λίγα, σχηματίζονται πολλά μόρια cccDNA. Καθώς, όμως, η λοίμωξη συνεχίζεται, ασκείται αρνητική ανάδραση (negative feedback) στο cccDNA και σχηματίζονται περισσότερα βίρια.

Η ρύθμιση των επιπέδων του cccDNA είναι ζωτικής σημασίας για την παραμονή του HBV στον οργανισμό. Υπολογίζεται ότι υπάρχουν 5 – 50 μόρια ανά ηπατοκύτταρο, τα οποία έχουν μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής. Σε αυτή την αδυναμία του ηπατοκυττάρου να απαλλαγεί από το cccDNA οφείλεται η χρονιότητα της λοίμωξης και η αντοχή σε θεραπευτικά σχήματα. Επομένως, η εκκρίωση του συγκεκριμένου μορίου από το ήπαρ αποτελεί μείζονα θεραπευτικό στόχο, προκειμένου να επιτευχθεί η οριστική θεραπεία από τη νόσο.

1. 4. Ορολογική διάγνωση του HBV

Ζωτικής σημασίας για τη μείωση του φορτίου της νόσου είναι η έγκαιρη διάγνωση της λοίμωξης από HBV. Χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο προς αυτή την κατεύθυνση αποτελούν οι ορολογικές εξετάσεις, κατά τις οποίες αρχικά ελέγχεται η τυχόν παρουσία των προαναφερθέντων αντιγόνων του ιού στον ορό του ασθενούς (με εξαίρεση το HBcAg που παραμένει εντός του ηπατοκυττάρου και δεν εκκρίνεται), καθώς και η παραγωγή αντισωμάτων έναντι αυτών από το ανοσοποιητικό σύστημα. Πέρα από την ποιοτική ανίχνευση, ο ορολογικός έλεγχος επιτρέπει και τον ποσοτικό προσδιορισμό των προς εξέταση δεικτών, με μεθόδους που θα περιγραφούν στη συνέχεια.

Πιο συγκεκριμένα, οι ορολογικοί δείκτες για τους οποίους γίνεται έλεγχος είναι το HBsAg, αντισώματα έναντι αυτού ή anti – HBs, HBeAg και αντισώματα (anti – HBe) και αντισώματα έναντι του HBcAg ή anti – HBc, τα οποία είναι ανοσοσφαιρίνες τάξης γ (IgG) και μ (IgM).

Το αντιγόνο επιφανείας HBsAg εμφανίζεται στον ορό των ασθενών εντός 1 – 10 εβδομάδων από τη λοίμωξη και η παραμονή του πέραν των 6 μηνών υποδηλώνει χρόνια λοίμωξη. Στη λανθάνουσα ή κρυψιγενή ηπατίτιδα Β, ο δείκτης αυτός δεν ανιχνεύεται, σε αντίθεση με το ιϊκό φορτίο του ιού (HBV DNA), που είναι παρόν. Από την άλλη, τα anti – HBs είναι γνωστά ως εξουδετερωτικά αντισώματα και παρέχουν μακροχρόνια ανοσία. Είναι τα μοναδικά που ανιχνεύονται στον ορό εμβολιασθέντων, ενώ η ταυτόχρονη παρουσία anti – HBc IgG είναι δηλωτική παλαιάς λοίμωξης. (βλ. Σχήματα 3 και 4, Παράρτημα)

Οι δείκτες HBeAg και anti – HBe χρησιμοποιήθηκαν στο παρελθόν ως δείκτες λοιμογονικότητας και ενεργού πολλαπλασιασμού του ιού, αλλά έχουν εν πολλοίς αντικατασταθεί από την μέτρηση του

HBV DNA. Γενικά, με την εξαίρεση εκείνων των ασθενών στους οποίους μεταλλάξεις αναστέλλουν ή μειώνουν την παραγωγή HBeAg, η ορομετατροπή έχει συσχετιστεί με ύφεση της ηπατικής νόσου.

Κατά τη διάρκεια της οξείας λοίμωξης, 1 – 2 εβδομάδες μετά την παραγωγή του HBsAg, τα anti - HBc εμφανίζονται, παράλληλα με την έναρξη των συμπτωμάτων και την άνοδο των τιμών των αμινοτρανσφερασών (αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης ή ALT και αμινοτρανσφεράσης της ασπαργίνης ή AST). Ενώ η παρουσία των anti – HBc IgG είναι ισόβια, τα anti - HBc IgM παύουν να ανιχνεύονται εντός 6 μηνών, επομένως είναι καταρχάς δηλωτικά οξείας λοίμωξης ⁽⁵⁾.

Μεμονωμένη εμφάνιση των anti – HBc στον ορό του ασθενούς μπορεί να συμβεί σε μια από τις τρεις παρακάτω περιπτώσεις: Πρώτον, κατά την οξεία φάση της λοίμωξης, όταν εκείνος έχει απολέσει το HBsAg αλλά δεν έχουν παραχθεί ακόμη τα εξουδετερωτικά αντισώματα ("φάση παράθυρο"). Σε αυτή την περίπτωση, ο έλεγχος για anti – HBc IgM θα είναι θετικός και διαγνωστικά πολύτιμος. Δεύτερον, είναι δυνατόν τα αντισώματα αυτά να υπάρχουν, αλλά οι τίτλοι τους να είναι χαμηλότεροι από το όριο ανίχνευσης. Τρίτον, σε πάσχοντες από χρόνια ηπατίτιδα Β, υπάρχει πιθανότητα οι τίτλοι του αυστραλιανού αντιγόνου να είναι μη ανιχνεύσιμοι.

Εκτός από την πρωτοδιάγνωση της λοίμωξης από ιό της ηπατίτιδας Β, όμως, οι παραπάνω ορολογικοί δείκτες συνεισφέρουν στη διάκριση των κλινικών φάσεων της λοίμωξης, την αποσαφήνιση της φυσικής πορείας της χρόνιας ηπατίτιδας Β και στην παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία.

1. 5. Μοριακές μέθοδοι διάγνωσης

Καταρχάς, η μέτρηση του HBV DNA αποκαλύπτει την αναπαραγωγική δραστηριότητα του ιού. Το ιϊκό φορτίο είναι ανιχνεύσιμο από τον πρώτο μήνα μετά τη λοίμωξη και φτάνει στα μέγιστα επίπεδα (10^8 αντίγραφα / mL) τον τρίτο μήνα. Κατόπιν, μειώνεται σταδιακά στη χρόνια ηπατίτιδα Β ή αρνητικοποιείται πλήρως κατά την ίαση.

Οι κλινικές εφαρμογές της εξέτασης είναι πολλές: Είναι βοηθητική, όπως προαναφέρθηκε, στη διάγνωση της κρυπτογενούς ηπατίτιδας. Επίσης, υψηλότεροι τίτλοι έχουν συσχετιστεί με ταχύτερη εξέλιξη της νόσου και μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Τέλος, χρησιμοποιείται για την αναγνώριση εκείνων των ασθενών που χρήζουν θεραπείας, καθώς και για την παρακολούθηση της ανταπόκρισης σε αυτή.

Από τις διάφορες μεθόδους που είναι διαθέσιμες για προσδιορισμό του ιϊκού φορτίου, γενικά προτιμάται η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real – time Polymerase Chain Reaction ή RT – PCR), καθώς είναι μια πλήρως αυτοματοποιημένη ποσοτική μέθοδος, με την οποία αποφεύγονται και τυχόν επιμολύνσεις του δείγματος. Το φάσμα ανίχνευσης κυμαίνεται από 10 – 15 IU / ml κατ' ελάχιστον, μέχρι και 10^7 – 10^8 αντίγραφα του ιού. ⁽⁵⁾

Επιπλέον, ο προσδιορισμός του γονότυπου μπορεί να γίνει με διάφορες μεθόδους, όπως ανάστροφο υβριδισμό, διαφορετικά είδη PCR (όπως η προαναφερθείσα RT – PCR), μικροσυστοιχίες DNA, δοκιμασία υβριδισμού σε πολωμένο φως, ανάλυση γενώματος ή ανάλυση πολυμορφισμού μήκους θραύσματος περιορισμού (RFLP). Ανεξάρτητα από τη μέθοδο που θα χρησιμοποιηθεί, το αποτέλεσμα της γονοτύπησης έχει αντίκτυπο στην κλινική πράξη.

Για παράδειγμα, οι γονότυποι A και D συνδέονται συχνότερα με χρονιότητα σε σχέση με τους B και C. Επιπλέον, ο γονότυπος C θεωρείται παράγοντας κινδύνου για περιγεννητική μετάδοση ηπατίτιδας B και για σοβαρή ηπατική νόσο σε ενήλικες. Σε ό,τι αφορά τις πιθανές θεραπευτικές επιλογές, από την άλλη, οι A και B έχουν συσχετιστεί με καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία με ιντερφερόνη, ενώ ασθενείς που έχουν μολυνθεί με τους γονοτύπους B ή C έχουν λιγότερες πιθανότητες ανταπόκρισης στη θεραπεία με τενοφοβίρη. ⁽⁵⁾

1. 6. Φυσική πορεία της HBV λοίμωξης

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Μελέτης του Ήπατος (European Association for the Study of Liver ή EASL), η φυσική πορεία της λοίμωξης από HBV μπορεί να διαιρεθεί σε πέντε φάσεις (με την τελευταία να χαρακτηρίζεται από την απώλεια του HBsAg), λαμβάνοντας υπόψη την παρουσία ή όχι του HBeAg, το ιικό φορτίο, τα επίπεδα της ALT και την ύπαρξη ή όχι ηπατικής φλεγμονής⁽⁶⁾. Στην ουσία, η καινούρια ονοματολογία περιγράφει την κατάσταση της χρονιότητας διαχωρίζοντας την έννοια της λοίμωξης από τη φλεγμονή. Στην πράξη, όμως, η κατάταξη του εκάστοτε ασθενούς σε κάποια από τις εν λόγω φάσεις δεν είναι πάντοτε εύκολη, ενώ δεν περνούν όλοι οι ασθενείς διαδοχικά από αυτά τα στάδια. (βλ. Σχήμα 5, Παράρτημα)

Η πρώτη φάση, συχνότερη σε περίπτωση περιγεννητικής μετάδοσης του ιού και χαρακτηριζόμενη από υψηλή μεταδοτικότητα, ονομάζεται *"χρόνια λοίμωξη από HBV με θετικό HBeAg"* (μέχρι πρότινος καλούνταν και *"φάση ανοσοανοχής"*) και χαρακτηρίζεται από την παρουσία ανιχνεύσιμου HBeAg, υψηλό ιικό φορτίο, φυσιολογικές τιμές ALT και ελάχιστες ή καθόλου νεκροφλεγμονώδεις αλλοιώσεις ή ίνωση του ήπατος. Κατά τη δεύτερη φάση (*"χρόνια ηπατίτιδα Β με θετικό HBeAg"*), τα επίπεδα ALT είναι αυξημένα, ενώ παρατηρούνται μέτριου ή σοβαρού βαθμού ηπατικές αλλοιώσεις. Η εξέλιξη αυτής της φάσης ποικίλλει: Είτε θα ακολουθήσει η τρίτη φάση, με απώλεια του HBeAg, ορομετατροπή και μείωση του ιικού φορτίου (*"χρόνια λοίμωξη από HBV με αρνητικό HBeAg"* ή *"φάση χρόνιου ανενεργού φορέα"* ή *'Inactive Carrier - IC – phase'* στη διεθνή βιβλιογραφία), είτε ο ασθενής θα περάσει σε φάση *"χρόνιας*

ηπατίτιδας από HBV με αρνητικό HBeAg" – καλούμενη επίσης 'Chronic Hepatitis B' (CHB) στη διεθνή βιβλιογραφία.

Τα κριτήρια με βάση τα οποία ένας ασθενής κατατάσσεται στην IC και όχι στην CHB φάση είναι το χαμηλό ιϊκό φορτίο (<2000 IU / ml), οι φυσιολογικές τιμές τρανσαμινασών και η παρουσία ελάχιστου μόνο βαθμού ηπατικών αλλοιώσεων. Κατά την ποσοτική εκτίμησή του HBsAg, οι τιμές που συνήθως παρατηρούνται είναι χαμηλότερες από 1000 IU / ml. Η πρόγνωση των IC ασθενών είναι σαφώς καλύτερη, λαμβάνοντας υπόψη ότι οι χρόνιες επιπλοκές παρατηρούνται σπάνια, ενώ η πενταετής αθροιστική επίπτωση της κίρρωσης στους πάσχοντες από CHB εκτιμάται σε 8 – 20%, με το 2 – 5% των κίρρωτικών ασθενών να βρίσκεται σε κίνδυνο να αναπτύξει ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.

1.7. Οξεία επιδείνωση ηπατικής νόσου

Η οξεία επιδείνωση με αύξηση των τιμών των τρανσαμινασών κατά την λοίμωξη από HBV μπορεί να λάβει χώρα είτε κατά την δεύτερη από τις φάσεις που περιγράφηκαν παραπάνω, να οφείλεται δηλαδή στην αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος στον ιό και να καταλήξει στην ιϊκή κάθαρση, είτε να προκαλείται από αναζωπύρωση λόγω αυξημένου ιϊκού πολλαπλασιασμού και να παρατηρηθεί σε μία από τις επόμενες φάσεις (IC, CHB ή ακόμα και σε ασθενείς που έχουν απολέσει το HBsAg και υφίστανται κατόπιν αντίστροφη ορομετατροπή).

Σχηματικά, η αναζωπύρωση φαίνεται λαμβάνει χώρα σε δύο φάσεις: Αρχικά παρατηρείται αυξημένος ιϊκός πολλαπλασιασμός, τα επίπεδα του ιϊκού φορτίου αυξάνονται και μπορεί να επανεμφανιστούν τα HBeAg και HBsAg στον ορό των ασθενών, παρότι προηγουμένως είχαν αναπτύξει τα αντίστοιχα αντισώματα και είχε λάβει χώρα η κάθαρση. Κατόπιν, λόγω της ανοσολογικής απάντησης, εμφανίζεται η ενεργή νόσος, με αύξηση των ηπατικών ενζύμων και ανάλογη κλινική συμπτωματολογία. Η αλληλουχία των γεγονότων φαίνεται να περιλαμβάνει αρχικά τον ιϊκό πολλαπλασιασμό με την αύξηση του ιϊκού φορτίου HBV DNA και στη συνέχεια την αύξηση των ALT και AST και την εμφάνιση anti - HBc IgM στον ορό του ασθενούς,. Στην πράξη όμως φαίνεται ότι τα στάδια αυτά δεν είναι τόσο διακριτά και η δυναμική στη σχέση ιού – ανοσοποιητικού συστήματος μεταβάλλεται συνεχώς. (7)

Το βασικότερο αίτιο για αναζωπύρωση του ιού και έξαρση της νόσου είναι η ανοσοκαταστολή, η οποία μπορεί να παρατηρηθεί σε ασθενείς με νεόπλασμα, μεταμοσχευθέντες ή όσους βρίσκονται υπό χημειοθεραπεία. Όμως, μπορεί να παρατηρηθεί και αυτόματα,

συχνότερα σε ασθενείς με CHB και ειδικά σε αυτούς που είναι HBeAg+. Σε μελέτες από την Ασία, η ετήσια επίπτωση των εξάρσεων της νόσου υπολογίστηκε σε 4,3% - 10,3% σε πάσχοντες με μη ανιχνεύσιμο HBeAg, ενώ για εκείνους που ήταν θετικοί για το e αντιγόνο έχει αναφερθεί και ποσοστό που φτάνει το 28,6% ⁽⁸⁾.

Οι πιθανοί παράγοντες κινδύνου για αναζωπύρωση του HBV είναι ποικίλοι και ουσιαστικά αφορούν σε οποιοδήποτε εκλυτικό αίτιο μπορεί να επιδράσει στον ρυθμό πολλαπλασιασμού του ιού, μέσω μεταβολών στο ανοσολογικό προφίλ του οργανισμού. Ενδεικτικά αναφέρονται βακτηριακή λοίμωξη, χειρουργείο, εγκυμοσύνη, τοκετός και σωματικό ή ψυχολογικό στρες. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται συχνότερα σε άνδρες ομοφυλόφιλους και νοσούντες από τον ιό HIV (Human Immunodeficiency Virus), ειδικά κατά την έναρξη της θεραπείας. Τέλος, μπορεί λάβει χώρα σε ασθενείς που είτε σταματούν τη θεραπεία για ηπατίτιδα Β με νουκλεοσιδικά ανάλογα, είτε βρίσκονται σε φάση ανοσολογικής διέγερσης, την οποία προκαλεί η χορήγηση ιντερφερόνης, είτε εμφανίζουν ανθεκτικά στελέχη του ιού.

1. 8. Διαφορική διάγνωση οξείας ηπατίτιδας Β από έξαρση νόσου σε χρόνια ηπατίτιδα Β.

Ζωτικής σημασίας για την περαιτέρω διαχείριση ενός ικτερικού ασθενούς με θετικό HBsAg, είναι η διαφοροδιάγνωση ανάμεσα στην οξεία ηπατίτιδα Β (acute hepatitis B ή AHB) και την CHB σε έξαρση. Αν και η λήψη ενός λεπτομερούς ιστορικού και η κλινική εξέταση μπορούν να κατευδύνουν τον κλινικό, η συνολική εικόνα είναι πολλές φορές πιο σύνθετη. Παρότι η CHB είναι συνήθως ασυμπτωματική, δεν είναι σπάνιο μια κρίση ή αναζωπύρωση με βασική εκδήλωση τον ίκτερο (εν γένει συνηδέστερο στην οξεία ηπατίτιδα Β) να είναι η πρώτη εκδήλωση της νόσου. Από την άλλη, σημεία όπως η σπληνομεγαλία ή ο ασκίτης, δηλωτικά χρόνια υποκείμενης ηπατοπάθειας, μπορεί να απουσιάζουν⁽⁷⁾.

Από τους εργαστηριακές εξετάσεις, σίγουρα η μέτρηση των επιπέδων των τρανσαμινασών και της τιμής της χολερυθρίνης δε μπορεί να συνεισφέρει στη διαφοροδιάγνωση μεταξύ των δύο αυτών κλινικών οντοτήτων. Το ίδιο ισχύει και για την ανίχνευση των HBc IgG (παρόντα και στις δύο περιπτώσεις) και του HBeAg (ειδικά όταν αυτό απουσιάζει).

Πιο χρήσιμα διαγνωστικά εργαλεία αποτελούν η μέτρηση του ιικού φορτίου και η ποσοτική εκτίμηση των HBsAg και HBc IgM. Μελέτες έχουν δείξει ότι το HBV DNA τείνει να είναι μη ανιχνεύσιμο ή σε χαμηλά επίπεδα κατά την οξεία ηπατίτιδα Β, ενώ χαμηλότερες είναι και οι τιμές του αντιγόνου επιφανείας του HBV (HBsAg). Τα HBc IgM αντισώματα, με τη σειρά τους, φαίνονται να είναι ένας αξιόπιστος βιοδείκτης. Αρχικά, με τις παλαιότερες μεθόδους ανίχνευσης, τα εν λόγω αντισώματα θεωρούνταν ειδικά για την οξεία ηπατίτιδα Β,

εντούτοις η παρουσία τους, αν και σε χαμηλότερους τίτλους, είχε επισημανθεί στα 3/4 των ασθενών με CHB.

1. 9. Δοκιμασίες για την ανίχνευση anti – HBc IgM

1. 9. 1. Η ανοσοενζυμική μέθοδος μικροσωματιδίων

Η πρώτη ημιποσοτική δοκιμασία που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των Hbc IgM και για την οποία υπάρχει εκτεταμένη εμπειρία, στηριζόταν σε μικροσωματιδιακές ανοσοενζυμικές μεθόδους (Microparticle Enzyme Immunoassays – MEIA) με τους αναλυτές IMx αρχικά και AXSYM αργότερα. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στη χρήση μικροσωματιδίων επικαλυμμένων με HBc Ag για τον έλεγχο ενός συγκεκριμένου κλινικού δείγματος. Όταν το σφαιρίδιο συνδυάζεται με το δείγμα και επώάζεται, το αντίστοιχο αντίσωμα στο δείγμα συνδέεται με το σφαιρίδιο. Οι μη συνδεδεμένοι παράγοντες εκπλένονται. Στο επόμενο βήμα, προστίθεται το ιχνηθετημένο με ένζυμο αλκαλικής φωσφατάσης αντιγόνο (ανασυνδυασμένο HBc Ag από E.coli). Αν υπάρχει στο δείγμα το υπό ανίχνευση αντίσωμα, διαμορφώνεται ένα σύμπλοκο αντιγόνου - αντισώματος-αντιγόνου/ενζύμου (sandwich). Το μη συνδεδεμένο ένζυμο απομακρύνεται με έκπλυση. Στη συνέχεια, προστίθεται ένα κατάλληλο αντιδραστήριο (4 – MethylUmbelliferyl Phosphate ή MUP) και το φθορίζον προϊόν μετράται από τον αναλυτή. (βλ. Σχήμα 6, Παράρτημα)

Η παρουσία των HBc IgM υποδηλώνεται από την αναλογία σχηματισμού φθορίζοντος προϊόντος στο δείγμα με τη μέση τιμή του διαλύματος βαθμονόμησης (calibrator) και έτσι προκύπτει μια τιμή Index. Δείγματα με τιμή Index ≥ 1.2 θεωρούνται σαφώς θετικά και δηλωτικά οξείας ηπατίτιδας B, τιμές 0.8 – 1.2 βρίσκονται στη λεγόμενη "γκρίζα ζώνη", ενώ όταν το Index είναι μικρότερο από 0.8, το δείγμα είναι αρνητικό για τα εν λόγω αντισώματα ⁽⁹⁾.

1. 9. 2. Μέθοδος χημειοφωταύγειας

Οι επόμενοι αυτόματοι αναλυτές που χρησιμοποιήθηκαν (Architect, Abbott Laboratories) για την ανίχνευση του συγκεκριμένου βιοδείκτη, βασίζονταν σε δοκιμασίες χημειοφωταύγειας (Chemiluminescent Assays – CMIA) (βλ. Σχήμα 7, Παράρτημα). Η εξέταση λάμβανε χώρα σε δύο στάδια: Στην πρώτη φάση, παραμαγνητικά μικροσωματίδια επενδυμένα με μονοκλωνικά anti – IgM από ποντικό επωάζονται με το δείγμα του ασθενούς και, επί παρουσία ανθρώπινων IgM έναντι της πυρηνοπρωτεΐνης του HBV, δημιουργείται σύμπλοκο. Στη δεύτερη φάση, ύστερα από έκπλυση, προστίθεται ανασυνδυασμένο HBcAg σεσημασμένο με ακριδίνη και κατόπιν διαλύματα Pre – Trigger και Trigger, τα οποία διευκολύνουν και σταθεροποιούν την αντίδραση.

Το παραγόμενο προϊόν χημειοφωταύγειας μετράται σε Σχετικές Μονάδες Φωτός (Relative Light Units – RLUs). Τα ανιχνευόμενα από τον αναλυτή RLUs είναι ανάλογα του ποσού των αντισωμάτων στον ορό του ασθενούς και αν το παραγόμενο σήμα είναι μεγαλύτερο από την κατώτατη τιμή cutoff που έχει οριστεί ύστερα από βαθμονόμηση, η δοκιμασία είναι θετική. Με άλλα λόγια, δείγματα με τιμή S / CO (Sample / Cutoff rate) ≥ 1 είναι θετικά, ενώ δείγματα με τιμή <1 είναι αρνητικά για HBc IgM αντισώματα ⁽⁹⁾.

1. 9. 3. Σύγκριση των παραπάνω μεθόδων

Όταν οι δυο παραπάνω μέθοδοι (MEIA και CMIA) και οι τρεις αναλυτές (IMx, Axsym, Architect) συγκρίθηκαν ως προς την ακρίβεια και την επαναληψιμότητά τους σε 53 δείγματα ασθενών με CHB, διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές στην εκτίμηση του επιπέδου των HBc IgM.

Έχοντας τον IMx ως αναλυτή αναφοράς, ο Axsym υπερεκτίμησε τις μέσες τιμές αντισωμάτων κατά **21%**, ενώ ο Architect τις υποεκτίμησε κατά **34.2%**. Ειδικά για τιμές που βρίσκονταν στη "γκρίζα ζώνη" με MEIA και πιθανόν να υποδήλωναν έξαρση της νόσου, από τον Architect (CMIA) **προέκυψαν αρνητικά αποτελέσματα για το 52% αυτών των ασθενών**. Με άλλα λόγια, οι δοκιμασίες χημειοφωταύγειας δε φάνηκε να είναι ημιποσοτικές και αξιόπιστες για τη διάγνωση της ενεργοποίησης της CHB ⁽¹⁰⁾.

1. 9. 4. Η ποσοτική ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA

Με τις MEIA μεθόδους να έχουν εκλείψει πια από το περισσότερα εργαστήρια και τις CMIA να τις έχουν αντικαταστήσει, γεννήθηκε η ανάγκη για μια αξιόπιστη ποσοτική δοκιμασία για προσδιορισμό των τιμών των HBc IgM αντισωμάτων. Για αυτό το σκοπό προέκυψαν ποσοτικές ανοσοενζυμικές μέθοδοι ELISA, μεταξύ των οποίων και η χειροκίνητη ELISA της Dia.Pro. (βλ. 2. 1. 3. για λεπτομερή ανάλυση της μεθόδου

και Σχήμα 8 στο Παράρτημα)

2. ΚΥΡΙΟ ΜΕΡΟΣ

2. 1. Μεθοδολογία

2. 1. 1. Σκοπός της μελέτης

Η παρούσα εργασία είχε ως στόχο την αξιολόγηση μιας νέας ποσοτικής δοκιμασίας ELISA για τη μέτρηση των επιπέδων των anti – HBc IgM. Επίσης εξετάστηκε εάν τα επίπεδα αυτών μπορούν να αποτελέσουν ικανό βιοδείκτη ενεργότητας CHB νόσου, όπως αυτή υποδηλώνεται από την άνοδο των τιμών των τρανσαμινασών και το υψηλό ιικό φορτίο. Επιπλέον, με έμφαση σε εκείνες τις τιμές που κυμαίνονταν στη λεγόμενη "γκρίζα ζώνη" ανίχνευσης (τιμή index 0.5 – 1.2), επιχειρήθηκε ο καθορισμός ενός κλινικά σημαντικού ορίου ανιχνεύσιμων αντισωμάτων.

2. 1. 2. Σχεδιασμός και πληθυσμός της μελέτης

Πρόκειται για αναδρομική περιγραφική μελέτη. Αρχικά εξετάστηκαν οι ηλεκτρονικοί φάκελοι των ασθενών (n = 344) με χρόνια ηπατίτιδα Β, οι οποίοι προσήλθαν στο Ερευνητικό Εργαστήριο της Β' Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών από 01/12/2016 μέχρι και 28/02/2019 για εκτίμηση των επιπέδων HBc IgM. Κατόπιν, στην υποομάδα των ασθενών με τιμή index αντισωμάτων ≥ 0.5 (n = 39) αναζητήθηκαν οι τιμές τρανσαμινασών (ALT, AST) για το ίδιο χρονικό διάστημα, καθώς και οι τιμές του επιφανειακού αντιγόνου του HBV και το ιικό φορτίο, όπου αυτά ήταν

διαθέσιμα, ως δείκτες πιθανής ενεργοποίησης νόσου. Παράλληλα, καταγράφηκαν οι τιμές των παρακάτω βιοδεικτών από το βιοχημικό έλεγχο, τη γενική αίματος, τον έλεγχο πηκτικότητας και καρκινικών δεικτών: ALP (αλκαλικής φωσφατάσης), γGT (γ - γλουταμυλοτρανσφεράσης), ολικής και άμεσης χολερυθρίνης, ουρίας, σακχάρου, αλβουμίνης, LDL (λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας), τριγλυκεριδίων, χρόνου προθρομβίνης, αιματοκρίτη, αιμοπεταλίων και α - εμβρυϊκής σφαιρίνης (α - FP) για να ελεγχθούν για τυχόν συσχετίσεις.

Όλα τα δεδομένα καταχωρήθηκαν σε ανώνυμη βάση δεδομένων. Δεν ελήφθη νέα έγκριση του επιστημονικού συμβουλίου, καθώς όλοι οι ασθενείς είχαν υπογράψει συγκατάθεση καταχώρησης δεδομένων κατά τη διάρκεια της κλινικής τους παρακολούθησης στο Ιπποκράτειο νοσοκομείο.

Στη συνέχεια διενεργήθηκε μια αναδρομικού τύπου (cross – sectional) μελέτη, δεδομένου ότι για 8 από τους 39 ασθενείς με HBc IgM πάνω από το προαναφερθέν όριο ανίχνευσης, υπήρχαν προηγούμενες μετρήσεις με σαφώς αρνητικά αντισώματα. Αυτοί οι ασθενείς λοιπόν λειτούργησαν ως μάρτυρες (controls) του εαυτού τους προκειμένου να ελεγχθεί η υπόθεση της συσχέτισης των επιπέδων HBc IgM με έξαρση της ηπατικής νόσου.

2. 1. 3. Εργαστηριακή μεθοδολογία

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση των HBc IgM αντισωμάτων ήταν μια ενζυμική ανοσοπροσροφητική ανάλυση τύπου σύλληψης ή capture ELISA (Dia.Pro, Italy). Στηρίζεται στην αρχή της "σύλληψης των IgM",

σύμφωνα με την οποία τα IgM από τον ορό του ασθενούς δεσμεύονται από μια στερεή φάση, η οποία εν προκειμένω είναι εμβαδύνσεις ("πηγαδάκια") σε μια πλάκα, επενδυμένες με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού με ειδικότητα έναντι των ανθρώπινων IgM. Ύστερα από έκπλυση, η ανίχνευση γίνεται μέσω της σύνδεσης του συμπλόκου με ανασυνδυασμένο HBcAg, σημασμένου με μονοκλωνικό αντίσωμα με συνδεδεμένη υπεροξειδάση (HRP). Ακολουθεί επώαση, δεύτερη έκπλυση και προσθήκη του υποστρώματος / χρωμογόνου. Παρουσία υπεροξειδάσης, το άχροο υπόστρωμα αλλάζει χρώμα. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 450 nm και αντιστοίχιση με μονάδες PEI U (Paul Erlich Institute Units) / ml, σύμφωνα με τις καμπύλες βαθμονόμησης (calibration curves). Δείγματα με συγκέντρωση μικρότερη από 5 PEI U / ml θεωρούνται αρνητικά, αν η συγκέντρωση κυμαίνεται στο φάσμα 5 – 10 PEI U / ml βρίσκεται εντός της "γκρίζας ζώνης", ενώ για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 10 PEI U / ml, τα δείγματα θεωρούνται θετικά.

Για την εκτέλεση της παραπάνω δοκιμασίας χρησιμοποιήθηκε ορός από κάθε ασθενή, ύστερα από λήψη περιφερικού αίματος μετά από φλεβοκέντηση. Κάθε δείγμα διατηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 – 60 λεπτά, στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στις 3000 – 5000 στροφές ανά λεπτό για 10 – 15 λεπτά και καταψύχθηκε στους -80 βαθμούς Κελσίου μέχρι την πραγματοποίηση της εξέτασης ανά παρτίδες δειγμάτων, ύστερα από διάστημα 2 εβδομάδων κατά μέσο όρο.

2. 1. 4. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS v.22 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Για τον έλεγχο ύπαρξης συσχέτισης μεταξύ της εκάστοτε ποσοτικής μεταβλητής και μιας ποιοτικής με 2 κατηγορίες, χρησιμοποιήθηκαν τα Student's t – test όταν η ποσοτική μεταβλητή ακολουδούσε την κανονική κατανομή και το Mann – Whitney test, όταν η κατανομή της ποσοτικής μεταβλητής δεν ήταν κανονική. Προκειμένου να ελεγχθεί η ύπαρξη γραμμικής συσχέτισης ανάμεσα σε δύο ποσοτικές μεταβλητές, χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης του Spearman, λόγω της μη κανονικότητας των κατανομών. Η καμπύλη Λειτουργικού Χαρακτηριστικού Δέκτη ή ROC (Receiver Operating Curve) αποτέλεσε το εργαλείο με το οποίο επιχειρήθηκε να προσδιοριστεί η κατώτερη τιμή (cutoff) HBc IgM που είναι κλινικά σημαντική για έξαρση νόσου. Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά όταν το p – value (επίπεδο σημαντικότητας στο οποίο η αρχική υπόθεση μπορεί να απορριφθεί) ήταν μικρότερο του 0.05.

2. 2. Αποτελέσματα

Η δοκιμασία της ποσοτικής ELISA για προσδιορισμό των επιπέδων των HBc IgM αντισωμάτων πραγματοποιήθηκε συνολικά σε 344 δείγματα ορού και τιμές index $\geq 0,500$ παρατηρήθηκαν σε 39 (11.3%). Από αυτά τα δείγματα, 26 (66.7%) ανήκαν σε άνδρες, ενώ 13 σε γυναίκες (33.3%). Η μέση ηλικία των εξετασθέντων ήταν τα 55 έτη

(εύρος 31 – 82 έτη). Η μέση τιμή index που μετρήθηκε ήταν **1.229** (εύρος 0.505 – 3.008). Το φύλο και η ηλικία των εξετασθέντων δε συσχετίστηκε στατιστικά το επίπεδο των HBc IgM αντισωμάτων.

Κατόπιν, οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο ομάδες, ανάλογα με τα επίπεδα τρανσαμινασών. Η πρώτη περιέλαβε τους ασθενείς με φυσιολογικά επίπεδα τρανσαμινασών AST και ALT και η δεύτερη με παθολογικά, έχοντας χρησιμοποιήσει το όριο των **40 IU / L** ως ανώτατη φυσιολογική τιμή για κάθε παράμετρο. Το Mann – Whitney test που χρησιμοποιήθηκε για έλεγχο, δεδομένου ότι η μεταβλητή index για τα IgM αντισώματα δεν παρουσίαζε κανονική κατανομή, έδειξε στατιστική συσχέτιση των τιμών index με αμφότερες τις μεταβλητές ALT και AST. Πιο συγκεκριμένα, το p-value στην πρώτη περίπτωση ήταν **0.007** (< 0.05) και στη δεύτερη **0.018** (< 0.05) αντίστοιχα (βλ. Πίνακες 1 και 2, Παράρτημα).

Στη συνέχεια, προκειμένου να διερευνηθεί η ύπαρξη γραμμικής συσχέτισης ανάμεσα σε κάθε ένα από τα δύο παραπάνω ζεύγη μεταβλητών (HBc IgM index – ALT και HBc IgM index – AST, όπου χρησιμοποιήθηκαν πλέον οι ξεχωριστές τιμές τρανσαμινασών για κάθε ασθενή), εφαρμόστηκε ο συντελεστής συσχέτισης Spearman. Για το πρώτο ζεύγος μεταβλητών το p – value ήταν **μικρότερο από 0.001**, άρα η σχέση μεταξύ τους ήταν στατιστικά σημαντική και ο συντελεστής συσχέτισης ήταν **0.590** (βλ. Πίνακα 3, Παράρτημα), άρα εξέφραζε ελαφριά προς μέτρια θετική γραμμική συσχέτιση. Για το δεύτερο ζεύγος μεταβλητών, το p – value υπολογίστηκε στο **0.001** ($<< 0.05$), επομένως και πάλι διαπιστώθηκε στατιστική σημαντικότητα, με το συντελεστή συσχέτισης να εκτιμάται στο **0.505** (βλ. Πίνακα 4, Παράρτημα) και να εκφράζει ελαφριά θετική γραμμική συσχέτιση.

Με άλλα λόγια, οι τιμές HBc IgM φάνηκε να σχετίζονται γραμμικά με τα επίπεδα τρανσαμινασών, ισχυρότερα με την ALT και μάλιστα με τρόπο θετικό. Άρα, σε ασθενείς με τιμές index που δεν είναι σαφώς αρνητικές, αλλά κυμαίνονται από το κατώτερο όριο της "γκρίζας ζώνης" και άνω, παρατηρούνται και υψηλότερα επίπεδα αυτών των ηπατικών ενζύμων.

Όσον αφορά στον έλεγχο πιθανών συσχετίσεων των υπόλοιπων μεταβλητών με την τιμή index (ALP, γGT, σακχάρου, ουρίας, LDL, τριγλυκεριδίων, αλβουμίνης, α - FP, αιμοπεταλίων, αιματοκρίτη και χρόνου προθρομβίνης), οι μόνες μεταβλητές που φάνηκε να συσχετίζονται είναι η **ALP** και η **ολική χολερυθρίνη** ($p - value = 0.008 < 0.05$ στην πρώτη περίπτωση και $p - value = 0.015 < 0.05$ στη δεύτερη) (βλ. Πίνακα 5, Παράρτημα). Οι αντίστοιχοι συντελεστές συσχέτισης Spearman ήταν **0.702** (μέτρια θετική συσχέτιση) και **0.656** (μέτρια θετική συσχέτιση) αντίστοιχα.

Τα επίπεδα του ιϊκού φορτίου και οι τιμές του HBsAg δε συσχετίστηκαν με την τιμή index σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($p = 0.171$ και $p = 0.586$ αντίστοιχα). Το εύρημα, όμως, αυτό μπορεί να οφείλεται στο μικρό αριθμό παρατηρήσεων για αυτές τις μεταβλητές ($n = 17$ και $n = 19$ αντίστοιχα).

Έχοντας τεκμηριώσει τη συσχέτιση anti - HBc IgM index - τρανσαμινασών στο περιγραφικό σκέλος της μελέτης, κατόπιν παρατηρήθηκε ότι για τους 8 από τους 39 εξετασθέντες οι τιμές HBc IgM ήταν σαφώς αρνητικές ($index < 0.500$) σε προηγούμενους ελέγχους. Πραγματοποιήθηκε λοιπόν ένα μικρότερο δεύτερο σκέλος της μελέτης με αναδρομικό χαρακτήρα τύπου ασθενών - μαρτύρων (case control study), στο οποίο κάθε ασθενής είχε ως μάρτυρα (control) τον εαυτό του, με προηγούμενες αρνητικές τιμές HBc IgM.

Επιχειρήθηκε συσχέτιση με τις τιμές ηπατικών ενζύμων που είχαν μετρηθεί στο ίδιο, αρνητικό για αντισώματα, δείγμα ορού.

Συνολικά, προέκυψαν **26** δείγματα, 15 από μάρτυρες και 11 από ασθενείς (για κάποιους από τους ασθενείς υπήρχαν περισσότερες από μία μετρήσεις σε κάθε κατηγορία). Η μέση τιμή index υπολογίστηκε σε **0.935** για τους ασθενείς (εύρος τιμών 0.537 – 1.774) και σε **0.237** για τους μάρτυρες (εύρος τιμών 0.068 – 0.474).

Αυξημένες τιμές ALT (> 40 U / L) παρατηρήθηκαν στο **90%** των ασθενών, αλλά μόνο στο **7.7%** των μαρτύρων. Ο σχετικός κίνδυνος OR (Odds Ratio) για αύξηση της ALT όταν η τιμή index είναι μεγαλύτερη από 0.500, υπολογίστηκε σε 108 (95%CI 5.9 – 1970). Τα μεγάλα διαστήματα εμπιστευτικότητας οφείλεται σαφώς στο μικρό αριθμό των παρατηρήσεων, αλλά αξίζει να σημειωθεί ότι ο κίνδυνος στους ασθενείς είναι 5.9 φορές μεγαλύτερος από τους μάρτυρες, ακόμη και με τις πιο απαισιόδοξες στατιστικές εκτιμήσεις.

Αντιστοίχως για την AST, **60%** των ασθενών είχε αυξημένες τιμές, ενώ **7.7%** των μαρτύρων. Για τη μεταβλητή αυτή ο OR ήταν 18 (95%CI 1.6 – 199). Τονίζονται και πάλι τα μεγάλα διαστήματα εμπιστευτικότητας, ο μικρότερος σχετικός κίνδυνος σε σχέση με την ALT, αλλά και ότι η χαμηλότερη εκτιμώμενη τιμή είναι 1.6 και υπερβαίνει τη μονάδα, άρα ο κίνδυνος στους ασθενείς είναι σε κάθε περίπτωση μεγαλύτερος σε σχέση με τους μάρτυρες.

Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν οι καμπύλες ROC για το σύνολο των 39 ασθενών, προκειμένου να διερευνηθεί η διαγνωστική αξία της μέτρησης των επιπέδων HBc IgM στην πρόβλεψη παθολογικών τιμών ALT και AST. Και για τους δύο δείκτες, το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη (AOC) ήταν ικανοποιητικό. Στην πρώτη περίπτωση, υπολογίστηκε σε **0.798** με **p – value = 0.007**, ενώ το cutoff του index για το οποίο η δοκιμασία είχε την καλύτερη δυνατή ευαισθησία

και ειδικότητα ταυτόχρονα (**83.3%** και **77.8%** αντίστοιχα), ορίστηκε σε **0.678**. Για την AST, το αντίστοιχο AOC ήταν **0.776** με **p – value = 0.018**, ενώ το cutoff με τον καλύτερο συνδυασμό ευαισθησίας – ειδικότητας (**82.8%** και **75%** αντίστοιχα) υπολογίστηκε σε **0.678** επίσης. Συμπερασματικά, η κατώτερη τιμή index των HBc IgM που είναι κλινικά σημαντική, γιατί σχετίζεται με αύξηση τρανσαμινασών και έξαρση ηπατικής νόσου είναι **0.678** (βλ. Καμπύλη και Πίνακες 6 και 7, Παράρτημα).

3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Παραδοσιακά, η αύξηση των επιπέδων των HBc IgM αντισωμάτων στον ορό του ασθενούς έχει παρατηρηθεί στην οξεία ηπατίτιδα Β (AHB). Παρολαυτά, η παρουσία χαμηλών τίτλων των ίδιων αντισωμάτων στον ορό ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β (CHB) έχει περιγραφεί εκτενώς στη διεθνή βιβλιογραφία και έχει συσχετιστεί με ενεργή ηπατική νόσο ⁽¹¹⁾.

Πιο συγκεκριμένα, η αλληλουχία των γεγονότων που έχει προταθεί για να αντικατοπτρίσει το φαινόμενο της έξαρσης είναι η εξής; Θεωρείται ότι προηγείται ο ενεργός ιϊκός πολλαπλασιασμός, ακολουθεί η απάντηση μέσω της φυσικής ανοσίας που καταλήγει σε ηπατικές αλλοιώσεις, οπότε και παρατηρούνται αυξημένες τιμές ηπατικών ενζύμων και κατόπιν παράγονται μέσω της επίκτητης ανοσίας IgM (και IgG αντισώματα), τα οποία ανιχνεύονται στον ορό ⁽¹²⁾.

Ο ενεργός ιϊκός πολλαπλασιασμός θα περίμενε κανείς να καταλήξει σε αυξημένο ανιχνεύσιμο ιϊκό φορτίο. Στην πράξη, όμως, οι τίτλοι HBc – anti - IgM και HBV – DNA δε φαίνεται να έχουν συσχετιστεί βιβλιογραφικά ^{(13), (14), (15)}. Κάτι αντίστοιχο παρατηρήθηκε και στην παρούσα εργασία, αλλά το μη ικανοποιητικό p – value της συσχέτισης πιθανόν να οφείλεται στο ότι οι τιμές του ιϊκού φορτίου ήταν διαθέσιμες για λιγότερους από τους μισούς ασθενείς, οπότε δεν υπήρχε ικανός αριθμός παρατηρήσεων για να τεκμηριώσει στατιστική σημαντικότητα.

Μια πιθανή εξήγηση για τη μη συσχέτιση HBV – DNA και αντισωμάτων στη διεθνή βιβλιογραφία είναι ότι ίσως ο ιϊκός πολλαπλασιασμός και η ανοσολογική απάντηση (άρα και οι ηπατικές βλάβες) βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία και δε συνδέονται πάντα

με την αλληλουχία που περιγράφηκε παραπάνω. Υπάρχει περίπτωση να βρίσκεται σε εξέλιξη ενεργή ηπατική φλεγμονή απουσία ιϊκού πολλαπλασιασμού, ή η υποκείμενη παθογένεση στο ήπαρ να καθιστά τον ασθενή ευάλωτο στην ενεργοποίηση του ιού ⁽¹³⁾.

Ο τρόπος που εκτιμήθηκε η ενεργή ηπατική νόσος στην εργασία αυτή ήταν οι αύξηση των τιμών των ALT και AST. Οι διακυμάνσεις στις αμινοτρανσφεράσες και ειδικά στην ALT έχουν μελετηθεί και η ετήσια επίπτωση της αύξησης των τιμών τους έχει υπολογιστεί σε 2.9% σε ασθενείς με CHB και αθροιστικά σε 25.8% σε προοπτική μελέτη 399 ασθενών σε βάθος 9ετίας. Μάλιστα, στη συγκεκριμένη εργασία αναφέρεται ότι ασθενείς με αυξημένες τρανσαμινάσες βρίσκονται σε 8 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να μεταβούν από το στάδιο του ανενεργού φορέα (IC) σε CHB, δηλαδή σε φάση λοίμωξης, ανεξαρτήτως του ιϊκού φορτίου ⁽¹³⁾.

Στην δική μας εργασία, οι τιμές αμινοτρανσφερασών και index των HBc IgM αντισωμάτων δεν παρουσίασαν μόνο στατιστική συσχέτιση (με p – value στατιστικής σημαντικότητας), αλλά αποδείχτηκε μάλιστα ότι σχετίζονται και με τρόπο γραμμικό και εντονότερα η ALT (συντελεστής Spearman: 0.590). Μια ακόμη σημαντική παρατήρηση ήταν τα ικανοποιητικά AOC από τις καμπύλες ROC και για τα δύο ηπατικά ένζυμα και η τεκμηρίωση μίας κατώτερης τιμής cutoff (index >0.678) που να είναι διαγνωστική και προβλεπτική ηπατικής νόσου. Η τιμή αυτή εμπίπτει στη λεγόμενη "γκρίζα ζώνη" της μεθόδου, γεγονός που καθιστά το εύρημα ακόμη πιο σημαντικό.

Η "γκρίζα ζώνη" έχει περιγραφεί εκτενώς στη διεθνή βιβλιογραφία, αλλά μόνο για τις άλλες δύο μεθόδους ανίχνευσης αντισωμάτων: Καταρχάς, την ημιποσοτική MEIA, όπου και ορίστηκε σε 0.2 – 0.3 τιμές index και είναι γενικά αποδεκτή ^{(16), (17)}. Σε εργασία των Brunetto et al, μάλιστα, εκτιμήθηκε ότι το 8.5% των ασθενών με CHB σε φάση

ενεργοποίησης εμφάνιζαν τιμές αντισωμάτων εντός αυτής της ζώνης.

(18) Από την άλλη, απόπειρες έγιναν και για τις μεθόδους χημειοφωταύγειας, αλλά αυτές δεν φάνηκαν να είναι ημιποσοτικές. (19)

Εντούτοις, για την ποσοτική ELISA δεν υπάρχουν επαρκείς αναφορές στη "γκρίζα ζώνη" και, πιο συγκεκριμένα, δεν έχει καθοριστεί εκείνη η κατώτατη τιμή ή εύρος τιμών ανίχνευσης αντισωμάτων που να έχει κάποια κλινική σημασία (πέραν δηλαδή των σαφώς θετικών τιμών). Στην εργασία των Dao et al αναφέρεται μόνο ότι όταν η τιμή 5 IU / ml χρησιμοποιηθεί ως cutoff, το 96% των ασθενών με AHB την υπερβαίνουν, ενώ το 70% των ασθενών με CHB παρουσιάζουν πολύ χαμηλότερες τιμές ηπατικών ενζύμων. (20) Τα δικά μας ευρήματα, όμως, ήταν περισσότερο συγκεκριμένα.

Βέβαια, οι διακυμάνσεις στις τιμές των ηπατικών ενζύμων δεν είναι αποκλειστικότητα της ενεργοποίησης του HBV. Έχουν καταρχάς παρατηρηθεί και στο γενικό πληθυσμό, σε ποσοστό 8 – 30% και έχουν συσχετιστεί με το άρρεν φύλο, την ηλικία, την παχυσαρκία, την υπεργλυκαιμία, την υπερλιπιδαιμία, την κατανάλωση αλκοόλ και τη χρήση φαρμάκων (21) (γεγονός που εξηγεί την επιλογή των αντίστοιχων μεταβλητών από το βιοχημικό προφίλ των ασθενών, αλλά δεν προέκυψαν συσχετίσεις) . Μάλιστα, οι Bonino et al (22) αναφέρουν ότι πάνω από μία παθολογική τιμή παρατηρείται σε ασθενείς με CHB το χρόνο, το 60% των ασθενών έχει επανειλημμένες παθολογικές τιμές σε μετρήσεις, ενώ η πλειονότητά τους ομαλοποιείται σε επόμενες μετρήσεις.

Πράγματι, θα μπορούσαν να υπάρχουν συγχυτικοί παράγοντες στη σχέση που εξετάζεται στην παρούσα εργασία. Το δεύτερο σκέλος, όμως, όπου για κάθε έναν από τους 8 ασθενείς υπήρξαν επανειλημμένες μετρήσεις με αυξομειώσεις HBc IgM και εντονότατη

συσχέτιση και με τα δύο ηπατικά ένζυμα και ειδικά με την ALT, κάνει τα συμπεράσματά μας περισσότερο ασφαλή.

Παρολαυτά, ο βασικός περιορισμός αυτής της εργασίας είναι η σημειακή καταγραφή των παρατηρήσεων και το γεγονός ότι δεν υπήρξε προοπτική παρακολούθηση. Σε αντίστοιχες εργασίες στο μέλλον, η παρακολούθηση (follow – up) των ασθενών στο χρόνο, θα μπορούσε να παρέχει περισσότερες πληροφορίες.

Ένας άλλος περιορισμός είναι η μη συσχέτιση των παρατηρήσεων με την ανταπόκριση στη χορηγούμενη ή χορηγηθείσα θεραπεία ή τις ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις του ήπατος. Για παράδειγμα, σε εργασία τους, οι Zavaglia et al ανέδειξαν τη συσχέτιση των επιπέδων των HBc IgM αντισωμάτων με τα βιοπτικά ευρήματα σε ασθενείς με CHB.⁽²³⁾ Γενικά, έγινε προσπάθεια να συγκεντρωθούν περισσότερες κλινικές πληροφορίες, αλλά δεν ευοδώθηκε. Τελικά τα παραπάνω θα μπορούσαν να αποτελέσουν ερευνητικούς στόχους μελλοντικών εργασιών.

Τα ευρήματά μας καταδεικνύουν τη χρησιμότητα της ποσοτικής εκτίμησης των αντι – HBc IgM στην παρακολούθηση ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Β. Πρόκειται για μία μη επεμβατική, εύκολη και μη δαπανηρή μέθοδο που μπορεί να αποτελέσει πολύτιμο διαγνωστικό εργαλείο σε όλες τις φάσεις της νόσου.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. WHO, Epidemiological Update: Increasing mortality calls for action. Global Hepatitis Report 2017: 7 – 21.
2. ΚΕΕΛΠΝΟ, Συστάσεις εμβολιασμού για την Ηπατίτιδα Β.
3. Χούντα Αθηνά, Πλοιαρχοπούλου Φανή. Ηπατίτιδα Β. Παρουσίαση του Ηπατολογικού Ιατρείου της Δ' Πανεπιστημιακής Παθολογικής Κλινικής, Π. Γ. Ν. "Αττικόν".
4. Patrick Murray, Ken Rosenthal, Michael Pfaller. Hepatitis B virus. Medical Microbiology 2015, 8th edition: 686 – 693.
5. Song JE, Kim DY. Diagnosis of Hepatitis B. Ann Transl Med 2016 Sep; 4(18): 338
6. EASL 2017 Clinical practice guidelines on the management of hepatitis B virus infection. Journal of hepatology 2017, vol.67, 370-98.
7. Pankaj Puri. Acute Exacerbation of Chronic Hepatitis B: The Dilemma of Differentiation from Acute Viral Hepatitis B. J Clin Exp Hepatol. 2013 Dec; 3(4): 301–312.
8. Liaw Y.F., Tai D.I., Chu C.M., Pao C.C., Chen T.J. Acute exacerbation in chronic type B hepatitis: comparison between HBeAg and antibody-positive patients. Hepatology 1987 Jan-Feb;7(1):20-3.
9. Γεώργιος Θεοδωρίδης και συνεργάτες. Ανοσοϊστοχημικές μέθοδοι ανάλυσης. Βιοαναλυτική Χημεία 2015: 8-13
10. Hadziyannis E., Manesis E., Vassilopoulos D., Georgiou A., Archimandritis A. Performance characteristics of microparticle enzyme and chemiluminescence immunoassays for measurement of anti-HBc immunoglobulin M in sera of patients with HbeAg-

negative chronic hepatitis B virus infection. Clin Vaccine Immunol. 2008 Feb;15(2):385-7. Epub 2007 Dec 12.

11. Galli C., Orlandini E., Penzo L., Badiale R., Caltran G., Valverde S., Gessoni G. What is the role of serology for the study of chronic hepatitis B virus infection in the age of molecular biology? J Med Virol. 2008 Jun;80(6):974-9. doi: 10.1002/jmv.21179.

12. Mels G.C., Bellati G., Leandro G., Brunetto M.R., Vicari O., Borzio M., Piantino P., Fornaciari G., Scudeller G., Angeli G. et al. Fluctuations in viremia, aminotransferases and IgM antibody to hepatitis B core antigen in chronic hepatitis B patients with disease exacerbations. Liver 1994 Aug;14(4):175-81.

13. Hossein Farzi, Nasser Ebrahimi Daryani, Leila Mehrnoush, Shima Salimi, Seyed Moayed Alavian. Prognostic Values of Fluctuations in Serum Levels of Alanine Transaminase in Inactive Carrier State of HBV Infection. Hepat Mon 2014 May; 14(5): e17537

14. Zoulim F., Mimms L., Floreanni M., Pichoud C., Chemin I., Kay A., Vitvitski L., Trepo C. New assays for quantitative determination of viral markers in management of chronic hepatitis B virus infection. J Clin Microbiol. 1992 May;30(5):1111-9.

15. Yuan Q., Song L.W., Cavallone D., Moriconi F., Cherubini B., Colombatto P., Oliveri F., Coco B.A., Ricco G., Bonino F., Shih J.W., Xia N.S., Brunetto M.R. Total Hepatitis B Core Antigen Antibody, a Quantitative Non-Invasive Marker of Hepatitis B Virus Induced Liver Disease. PLoS One, 2015 Jun 26;10(6):e0130209. doi: 10.1371/journal.pone.0130209. Ecollection 2015.

16. Colloredo G., Bellati G., Colombatto P., Rho A., Bissoli F., Brunetto M.R., Angeli G., Ideo G., Bonino F. Quantitative analysis of IgM anti-HBc in chronic hepatitis B patients using a new "gray-

zone" for the evaluation of "borderline" values. *J Hepatol* 1996 Nov;25(5):644-8.

17. Colloredo Mels G., Bellati G., Leandro G., Vicari O., Piantino P., Borzio M., Angeli G., Ideo G., Bonino F. Role of IgM antibody to hepatitis B core antigen in the diagnosis of hepatitis B exacerbations. *Arch Virol Suppl.* 1993;8:203-11.

18. Brunetto M.R., Cerenzia M.T., Oliveri F., Piantino P., Randone A., Calvo P.L., Manzini P., Rocca G., Galli C., Bonino F. Monitoring the natural course and response to therapy of chronic hepatitis B with an automated semi-quantitative assay for IgM anti-HBc. *J Hepatol* 1993 Nov;19(3):431-6.

19. Hadziyannis S.J., Hadziyannis A.S., Dourakis S., Alexopoulou A., Horsch A., Hess G. Clinical significance of quantitative anti-HBc IgM assay in acute and chronic HBV infection. *Hepatogastroenterology* 1993 Dec;40(6):588-92.

20. Dao D.Y., Hynan L.S., Yuan H.-J., the Acute Liver Failure Study Group Two distinct subtypes of hepatitis B virus-related acute liver failure are separable by quantitative serum immunoglobulin M anti-hepatitis B core antibody and hepatitis B virus DNA levels. *Hepatology.* 2012;55:676–684.

21. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol.* 2003;98(5):960–7. doi: 10.1111/j.1572-0241.2003.07486.x.

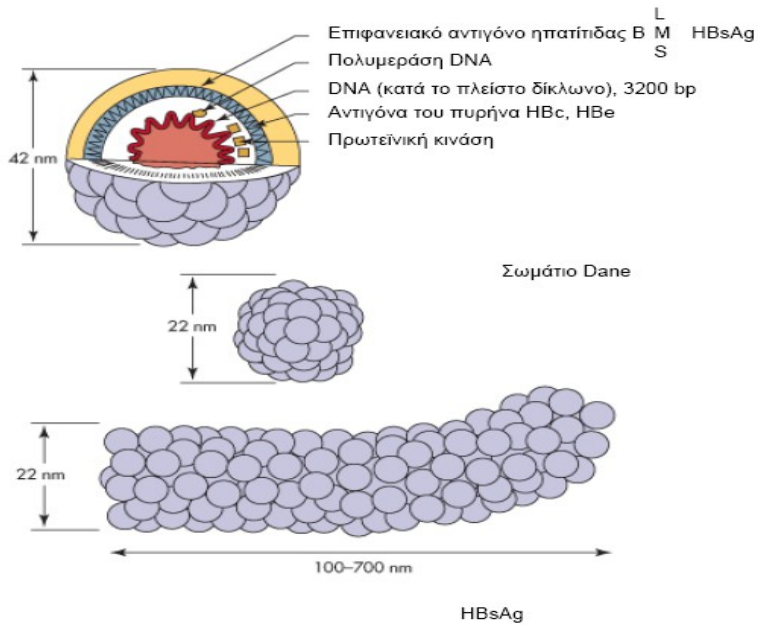
22. Bonino F, Brunetto MR. Chronic hepatitis B e antigen (HBeAg) negative, anti-HBe positive hepatitis B: an overview. *J Hepatol* 200;39 Suppl 1:S160-3

23. Zavaglia C., Mondazzi L., Maggi G., Iamoni G., Gelosa F., Bellati G., Colloredo G., Bottelli R., Ideo G. Are alanine

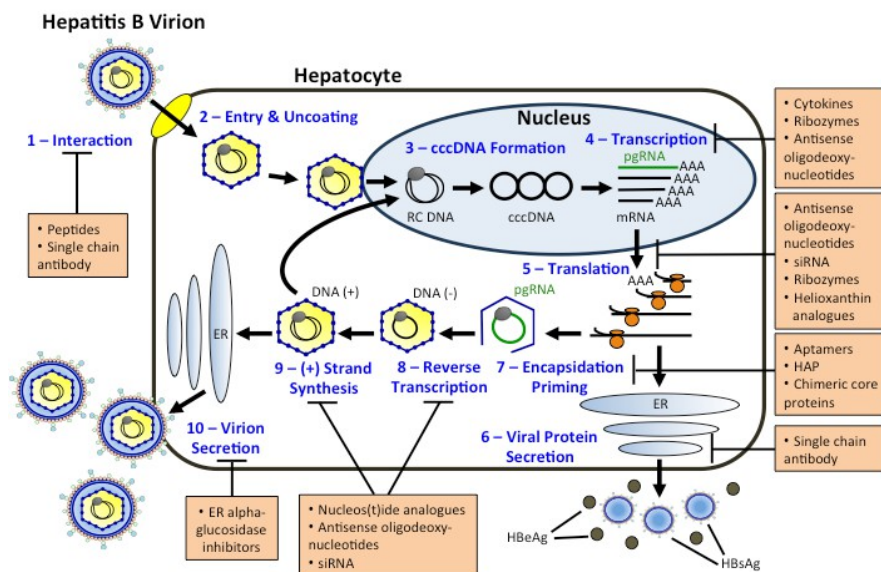
aminotransferase, hepatitis B virus DNA or IgM antibody to hepatitis B core antigen serum levels predictors of histological grading in chronic hepatitis B? Liver 1997 Apr;17(2):83-7.

5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

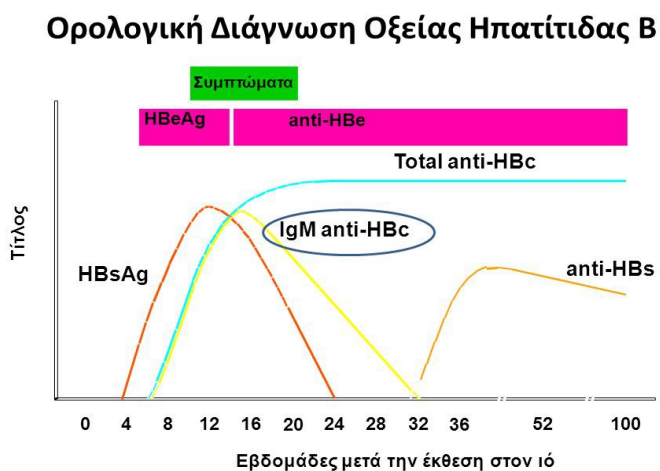
Σχήμα 1 – Δομή του ιού της ηπατίτιδας Β



Σχήμα 2 – Κύκλος ζωής του ιού



Σχήμα 3 – Ορολογικοί δείκτες σε ηπατίτιδα Β



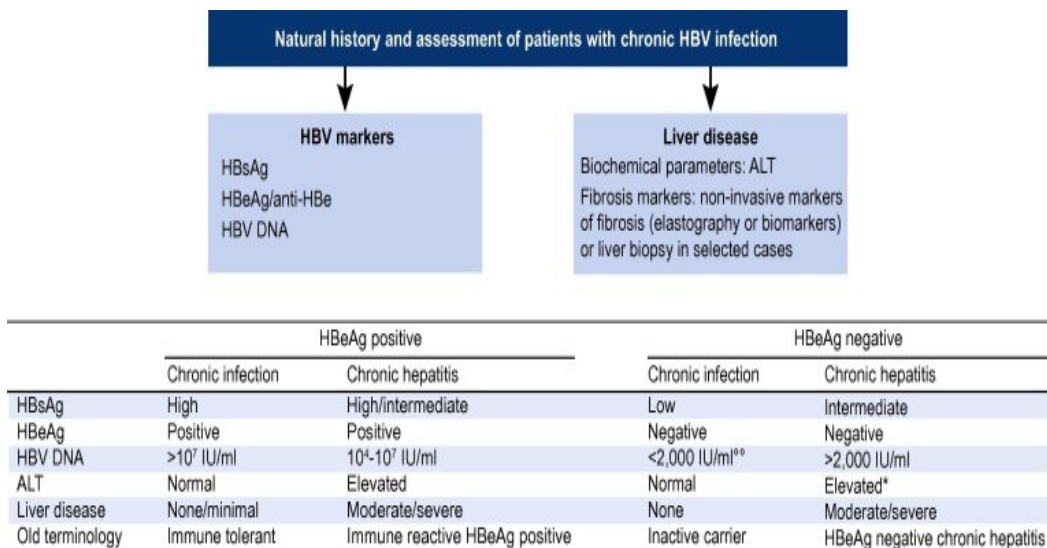
Σχήμα 4 – Ορολογική διάγνωση

Ορολογική Διάγνωση Ηπατίτιδας Β

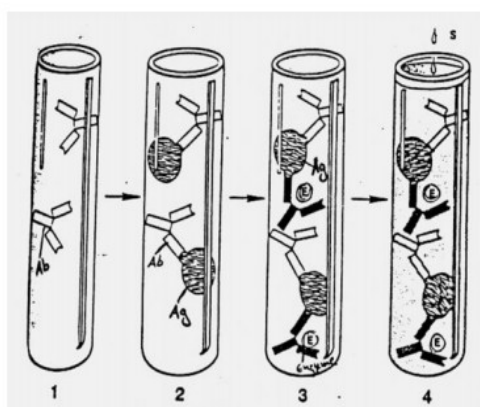
HBsAg	anti-HBc	anti-HBs	IgM anti-HBc	Αξιολόγηση
Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό		Επίνοσος
Αρνητικό	Θετικό	Θετικό		Παλαιά λοίμωξη Φυσική ανοσία
Αρνητικό	Αρνητικό	Θετικό		Εμβολιασμός
Θετικό	Θετικό	Αρνητικό	Θετικό	Οξεία λοίμωξη
Θετικό	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Χρόνια λοίμωξη
Αρνητικό	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Παλαιά? Χρόνια?

HBsAg / Anti-HBe

**Σχήμα 5 – Κατευθυντήριες οδηγίες Ευρωπαϊκής Εταιρείας
Μελέτης του Ήπατος για τις φάσεις της χρόνιας ηπατίτιδας Β ⁽⁶⁾**

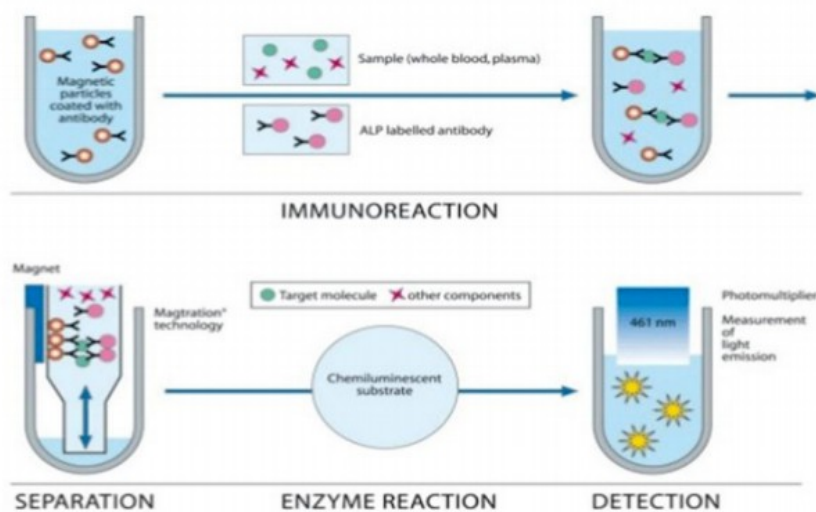


Σχήμα 6 – Βασικές αρχές ανοσοενζυμικών μεθόδων ⁽⁹⁾



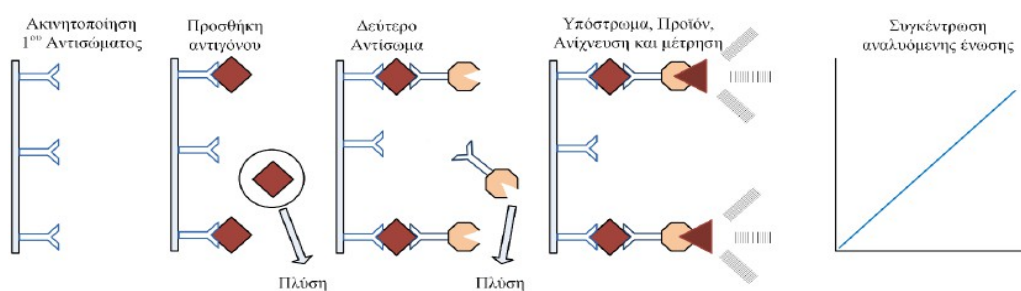
Εικόνα 8.68 Τα βασικά βήματα μιας ανοσοενζυμικής μεθόδου. Τα νοειδή σχήματα παριστάνουν αντισώματα [47]: Βήμα 1: Το αντίσωμα Ab κολλάει στο τοίχωμα του δοχείου. Βήμα 2: Προστίθεται αντιγόνο (Ag) και αντιδρά με το Ab. Βήμα 3: Προστίθεται ένα αντιγόνο, συνδεδεμένο με ένα ένζυμο (Ab-E) και αντιδρά με το σύμπλοκο Ag-Ab. Βήμα 4: Προστίθεται ένα υπόστρωμα (S) και το αναπτυσσόμενο χρώμα μετράται φωτομετρικά.

Σχήμα 7 – Βασικές αρχές χημειοφωταύγειας ⁽⁹⁾



Εικόνα 8.74 Τα βήματα της Μεθόδου Προσδιορισμού Άνοσο - Χημειοφωταύγειας [59]

Σχήμα 8 – Βασικές αρχές ELISA τύπου "sandwich" ⁽⁹⁾



Σχήμα 8.5. Πορεία ανάλυσης σε Sandwich ELISA. Από αριστερά προς τα δεξιά: Ακινητοποίηση 1ου αντισώματος. Δέσμευση αντιγόνου. Δέσμευση 2ου αντισώματος. Προσθήκη υποστρώματος και ανίχνευση. Η ένταση σήματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αναλυόμενης ένωσης.

Πίνακας 1 - Συσχέτιση IgM index > 0.500 με παθολογικές τιμές

ALT

Test Statistics^a

	HBcIgM
Mann-Whitney U	54,500
Wilcoxon W	99,500
Z	-2,683
Asymp. Sig. (2-tailed)	,007
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,006 ^b

a. Grouping Variable:

ALTNEW

b. Not corrected for ties.

Πίνακας 2 – Συσχέτιση IgM index > 0.500 με παθολογικές τιμές

AST

Test Statistics^a

	HBcIgM
Mann-Whitney U	52,000
Wilcoxon W	88,000
Z	-2,361
Asymp. Sig. (2-tailed)	,018
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,017 ^b

a. Grouping Variable:

ASTNEW

b. Not corrected for ties.

Πίνακας 3 – Γραμμική συσχέτιση IgM index – ALT

Correlations			HBcIgM	ALT
Spearman's rho	HBcIgM	Correlation Coefficient	1,000	,590**
		Sig. (2-tailed)	.	,000
		N	39	39
	ALT	Correlation Coefficient	,590**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,000	.
		N	39	39

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Πίνακας 4 – Γραμμική συσχέτιση IgM index – AST

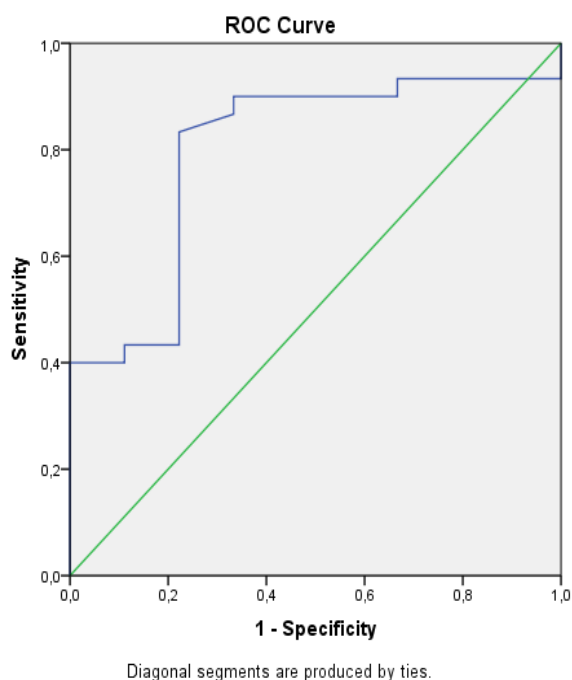
Correlations			HBcIgM	AST
Spearman's rho	HBcIgM	Correlation Coefficient	1,000	,505**
		Sig. (2-tailed)	.	,001
		N	39	37
	AST	Correlation Coefficient	,505**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,001	.
		N	37	37

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Πίνακας 5 – Συσχέτιση μεταβλητών με IgM index

Μεταβλητή	P - value
Φύλο	0,532
Ηλικία	0,788
Γλυκόζη	0,879
Ουρία	0,433
ALP	0,008
γGT	0,127
HCT	0,709
PLT	0,425
INR	0,092
LDL	0,531
Tri	0,978
AFP	0,879
Bil-total	0,015
Bil-direct	0,142
Alb	0,211

Καμπύλες ROC



Πίνακας 6 – AOC για την καμπύλη ROC IgM index - ALT

Area Under the Curve

Test Result Variable(s): HBcIgM

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
,798	,084	,007	,633	,964

The test result variable(s): HBcIgM has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group. Statistics may be biased.

a. Under the nonparametric assumption

b. Null hypothesis: true area = 0.5

Πίνακας 7 – Συντεταγμένες για επιλογή cutoff

Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s): HBcIgM

Positive if Greater Than or Equal To ^a	Sensitivity	1 - Specificity
-,49500	1,000	1,000
,51400	,967	1,000
,53000	,933	1,000
,53950	,933	,889
,56100	,933	,778
,58300	,933	,667
,58900	,900	,667
,59850	,900	,556
,61050	,900	,444
,62600	,900	,333
,64800	,867	,333
,67800	,833	,222
,70950	,800	,222
,74800	,767	,222
,80400	,733	,222
,84350	,700	,222
,89450	,667	,222
,95450	,633	,222
,98100	,600	,222
,99850	,567	,222
1,01000	,533	,222
1,09650	,500	,222
1,20150	,467	,222
1,26950	,433	,222
1,34000	,433	,111
1,38850	,400	,111
1,43200	,400	,000
1,47500	,367	,000
1,56250	,333	,000
1,64000	,300	,000
1,71400	,267	,000
1,83650	,233	,000

2,07800	,200	,000
2,26050	,167	,000
2,28950	,133	,000
2,40600	,100	,000
2,66650	,067	,000
3,17450	,033	,000
4,51300	,000	,000