

ΗΠΑΤΙΤΙΔΕΣ: ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ

Αιμιλία Στ. Χατζηγιάννη, Λέκτορας Βιοπαθολογίας
Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών, Ιπποκράτειο Γενικό Νοσοκομείο, Αθήνα

Η εφαρμογή νέων θεραπειών για τις ιογενείς ηπατίτιδες σε συνδυασμό με τη χρήση μεθόδων μοριακής βιολογίας στο κλινικό εργαστήριο έχουν οδηγήσει σε μεγάλες αλλαγές στον τρόπο διάγνωσης και παρακολούθησης κυρίως των χρόνιων λοιμώξεων από τους ιούς ηπατίτιδας Β και C.

Ηπατίτιδα Α

Ο ιός της ηπατίτιδας Α (HAV) ανακαλύφθηκε το 1973¹ και σταδιακά αναπτύχθηκαν διαγνωστικές εξετάσεις, κυτταροκαλλιέργεια, χαρακτηρισμός σε μοριακό επίπεδο και τελικά παραγωγή αποτελεσματικού εμβολίου^{2,3}. Πρόκειται για ηπατοτρόπο ιό που αναπαράγεται στο ήπαρ, προκαλεί ιαιμία και εκκρίνεται στη χολή και στα κόπρανα τα οποία περιέχουν έως 10⁹ λοιμογόνα σωματίδια ανά γραμμάριο και αποτελούν την κυρία πηγή της λοίμωξης. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση του ιού στα κόπρανα βρίσκεται πριν από την εμφάνιση ίκτερου. Η συγκέντρωση του HAV RNA στο αίμα είναι 2 με 3 δεκαδικούς λογάριθμους μικρότερη από αυτή των κοπράνων, παρουσιάζεται 1 με 2 εβδομάδες μετά την έκθεση στον ιό και παραμένει όλο το διάστημα αύξησης των ηπατικών ενζύμων^{3,4,5}.

Αντισώματα IgM (IgM anti-HAV) ανιχνεύονται στον ορό κατά ή και προ της έναρξης κλινικών συμπτωμάτων και παραμένουν ανιχνεύσιμα επί 3-6 μήνες οπότε τα επίπεδα είναι χαμηλά κάτω από το όριο ευαισθησίας των εμπορικά διαθέσιμων μεθόδων⁶. Αποτελούν την εξέταση εκλογής για τη διάγνωση της οξείας ηπατίτιδας Α. IgM anti-HAV αντισώματα αναπτύσσονται παροδικά μετά από εμβόλιο σε ποσοστό 8-20 %⁷.

IgG αντισώματα ανιχνεύονται στον ορό μετά τα IgM παραμένουν δε ανιχνεύσιμα για πολλά χρόνια και προσδίδουν ανοσία εφόρου ζωής. Εξετάζονται για τη διάγνωση παρελθούσας λοίμωξης και για τον έλεγχο αποτελεσματικότητας του εμβολίου. Οι εμπορικά διαθέσιμες μέθοδοι δεν εξετάζουν anti-HAV IgG μόνο αλλά ολικά anti-HAV αντισώματα (IgM και IgG). Η παρουσία ολικού anti-HAV και η απουσία IgM anti-HAV θέτουν τη διάγνωση της παρελθούσας λοίμωξης. Η ευαισθησία του ολικού anti-HAV δεν είναι αρκετή έτσι ώστε ένα ποσοστό εμβολιασμένων φαίνεται να χάνει τα αντισώματα ιδίως μετά την πάροδο μερικών ετών από τον εμβολιασμό⁸.

IgG και IgA αντισώματα ανιχνεύονται στον ορό, σάλιο, ούρα και κόπρανα. Έχει γίνει προσπάθεια να χρησιμοποιηθεί το σάλιο σαν δείγμα λόγω της ευκολίας λήψης του, όμως οι μέθοδοι που αναπτύχθηκαν στερούνται ευαισθησίας και δεν εφαρμόστηκαν ευρέως.

Μοριακές μέθοδοι διάγνωσης αναμένεται να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά και μετά την ευρεία εφαρμογή του εμβολίου για την εντόπιση των υπολοίπων ασυμπτωματικών λοιμώξεων καθώς και για το γενετικό χαρακτηρισμό του ιού που πιθανόν να προσβάλει εμβολιασμένα άτομα.

Ηπατίτιδα Β

Ο ιός της ηπατίτιδας Β (HBV) εκτός από οξεία προκαλεί και χρόνια λοίμωξη και αποτελεί παγκόσμιο πρόβλημα δημόσιας υγείας. Στη χρόνια λοίμωξη το HBV DNA σε μορφή διπλής έλικας

σχηματίζει ένα κλειστό κύκλο (covalently closed circular DNA ή cccDNA) στον πυρήνα των κυττάρων του ξενιστή. Το cccDNA είναι ο τρόπος με τον οποίο ο HBV επιτυγχάνει τη χρονία παραμονή και αναπαραγωγή του στα ηπατοκύτταρα⁹.

Η οξεία HBV λοίμωξη διαγιγνώσκεται με την ανίχνευση του αντιγόνου επιφάνειας (HBsAg) και αντισωμάτων IgM έναντι του πυρηνοκαψιδίου του ιού (IgM anti-HBc). Τα αντισώματα αυτά μπορεί να ανιχνευτούν σε χαμηλότερο όμως τίτλο και σε ενεργοποίηση χρονίας HBV λοίμωξης^{10,11}. Αντισώματα anti-HBs ανιχνεύονται σε παρελθούσα λοίμωξη και μετά από εμβολιασμό.

Στη χρονία λοίμωξη συνήθως ανιχνεύονται HBsAg και IgG anti-HBc με αρνητικό το anti-HBs. Συχνό εύρημα είναι η ανίχνευση μόνο του anti-HBc αντισώματος με αρνητικούς τους υπόλοιπους δείκτες. Το εύρημα αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε παλαιά HBV λοίμωξη, είτε σε χρονία HBV λοίμωξη, σε HCV ή HIV λοίμωξη είτε να είναι ψευδώς θετικό (χαμηλή αντίδραση). Ιδιαίτερη προσοχή και παρακολούθηση με μέτρηση του HBV DNA στον ορό χρειάζεται σε ασθενείς με anti-HBc μόνο οι οποίοι πρόκειται να υποβληθούν σε ανοσοκατασταλτική αγωγή, λόγω πιθανής ενεργοποίησης του ιού και οξείας ηπατικής βλάβης μετά το τέλος της θεραπείας και αποκατάστασης του ανοσολογικού συστήματος^{12,13,14}.

Δύο τύποι χρονίας λοίμωξης διαχωρίζονται σε σχέση με την παρουσία του αντιγόνου e (HBeAg). Στη χώρα μας είναι συχνή η HBeAg αρνητική χρονία ηπατίτιδα. Μεταλλαγές στην προπυρηνική περιοχή του ιού έχουν βρεθεί σε HBeAg αρνητικούς ασθενείς με ιαμία και ενεργό ηπατική νόσο¹⁵. Η G1896A είναι η κύρια μεταλλαγή που εμποδίζει τη μετάφραση της προπυρηνικής πρωτεΐνης και αναστέλλει την παραγωγή του HBeAg. Η επιλογή της μεταλλαγής αυτής σχετίζεται με τον γονότυπο του ιού και είναι πιο συχνή στους γονότυπους B και D^{16,17}. Στην Ελλάδα ο γονότυπος D βρίσκεται στην πλειονότητα των ασθενών. Οι ασθενείς με HBeAg αρνητική χρονία ηπατίτιδα B έχουν πιο χαμηλά επίπεδα HBV DNA από τους HBeAg θετικούς.

Η ανταπόκριση σε αγωγή με ιντερφερόνη σε HBe θετικούς ασθενείς εξετάζεται με την εμφάνιση anti-HBe αντισωμάτων. Η ανταπόκριση σε HBe αρνητικούς ασθενείς σε αντική αγωγή με νουκλεοσ/τιδικά ανάλογα παρακολουθείται με τη μέτρηση του ιικού φορτίου (HBV DNA) στον ορό. Η αντίστροφη μεταγραφάση του HBV είναι ένα ένζυμο που συμμετέχει στον κύκλο αναπαραγωγής του ιού και συχνά οδηγεί στην ενσωμάτωση διαφορετικών νουκλεοτιδίων στο γένωμά του (μεταλλαγές). Έτσι ο ιός κυκλοφορεί στον οργανισμό σε ένα μείγμα από διαφορετικά συγγενικά στελέχη (σχεδόν είδη) τα οποία βρίσκονται σε ισορροπία ανάλογα με το περιβάλλον. Υψηλά επίπεδα HBV DNA στον ορό προ της έναρξης αγωγής φαίνεται να σχετίζονται με την εμφάνιση στελεχών, με μεταλλαγές στη YMDD περιοχή της πολυμεράσης που έχουν αντοχή στη λαμβουδίνη (3TC) ενώ χαμηλά επίπεδα στους 3 μήνες μετά την έναρξη της αγωγής της αγωγής (<1000 αντίγραφα/mL) συσχετίζονται στατιστικά σημαντικά με τη μη ανάπτυξη αντοχής στους 12-15 μήνες παρακολούθησης. Παρότι ως ανταπόκριση στη θεραπεία θεωρείται η μείωση των επιπέδων του HBV DNA, δεν είναι ακόμη γνωστό ποια είναι τα επίπεδα στόχος που πρέπει να μετριοούνται. Μια ευαίσθητη μέθοδος πρέπει να ανιχνεύει 200 – 400 αντίγραφα/mL¹⁸.

Σε αποτυχία θεραπείας η μείωση του αρχικού ιικού φορτίου είναι μικρότερη από ένα δεκαδικό λογάριθμο (log) ή σημειώνεται αύξηση του ιικού φορτίου, σε σχέση με τη χαμηλότερη κατά την παρακολούθησή της αγωγής μέτρηση, κατά 1 log¹⁹.

Οι γονιδιακές μεταλλαγές που σχετίζονται με αντίσταση σε αντικα πρέπει να εξετάζονται σε περιπτώσεις αποτυχίας της αγωγής ή διαφυγής του ιού. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας (sequencing) αποτελεί τη μέθοδο αναφοράς. Άλλες μέθοδοι όπως ο αντίστροφος υβριδισμός (LIPA) μπορούν να ανιχνεύσουν μόνο ήδη γνωστές και μελετημένες μεταλλαγές (λαμβουδίνη: M204I, V173L, L180M / αδεφοβίρη: N236T, A181V) αλλά έχουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν να ανιχνεύσουν με

μεγαλύτερη ευαισθησία μεικτούς πληθυσμούς¹⁸. Αντοχή στη λαμβουδίνη βρίσκεται στο 14-32% των ασθενών μετά από ένα χρόνο θεραπείας, στο 38% μετά από 2 και στο 53-76% μετά από 3 χρόνια²⁰. Η αντοχή στην αδεφοβίρη αναπτύσσεται αργότερα. Μετά από 3 χρόνια μόνο στο 6-8% των ασθενών παρατηρείται ιική διαφυγή^{19,21}.

Μεταλλαγές έχουν παρατηρηθεί και στην περιοχή του HBsAg που επηρεάζουν τη σύνδεσή του με εξουδετερωτικά αντισώματα και μπορούν να οδηγήσουν σε μόλυνση μετά από εμβολιασμό (G145R, D144A). Συνήθως ανευρίσκονται σε εμβολιασμένα νεογνά από μητέρα HBV θετική και σε ασθενείς μετά από μεταμόσχευση ήπατος και χορήγηση anti-HBs αντισωμάτων ή υπεράνοσης σφαιρίνης²².

Ηπατίτιδα C

Ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV), ένας ιός που απομονώθηκε με μεθόδους μοριακής βιολογίας, προκαλεί χρόνια λοίμωξη σε ποσοστό 60-80% των ασθενών. Η διάγνωση της λοίμωξης γίνεται με την ανίχνευση του HCV RNA με ευαίσθητη μέθοδο (PCR ή TMA) στον ορό ασθενών με θετικά anti-HCV αντισώματα^{23,24}.

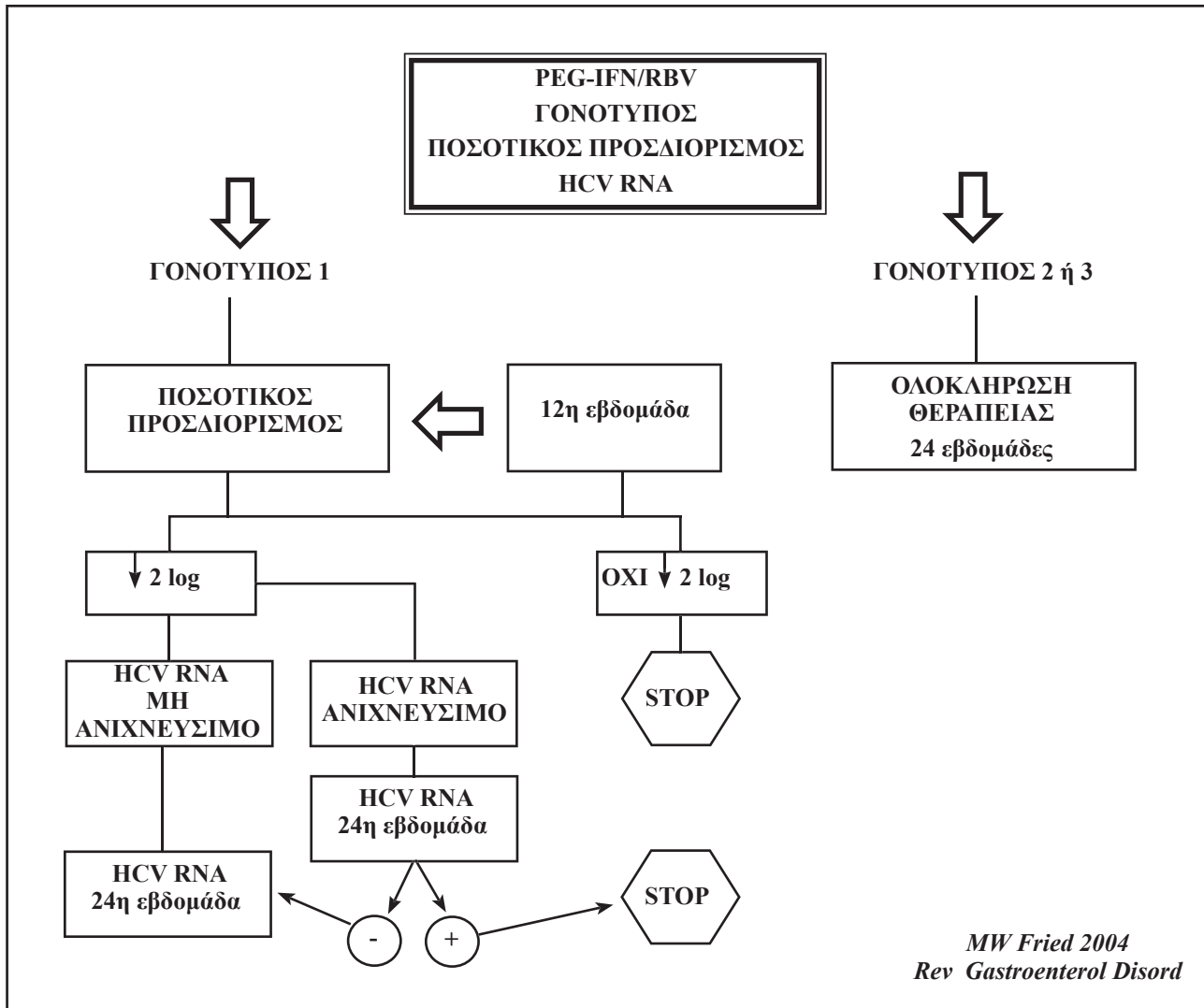
Η θεραπεία της χρόνιας HCV λοίμωξης γίνεται με συνδυασμό πεγκυλιωμένης ιντερφερόνης-άλφα (PEG-IFN-a) και ριμπαβιρίνης με κύριο στόχο την ιολογική ανταπόκριση (HCV RNA αρνητικό) διατηρούμενη μετά τη διακοπή της θεραπείας (SVR).

Το θεραπευτικό σχήμα που ακολουθείται εξαρτάται από τον γονότυπο του ιού και δευτερευόντως από το αρχικό ιικό φορτίο^{25,26,27}. Οι γονότυποι 2/3 ανταποκρίνονται στη θεραπεία σε μεγαλύτερο ποσοστό (>80%) από το γονότυπο 1 (55%) ενώ ο γονότυπος 4 του ιού ανταποκρίνεται σε ποσοστά ενδιάμεσα μεταξύ των γονότυπων 1 και 2/3. Στην Ελλάδα η κατανομή των HCV γονότυπων είναι 43% γονότυπος 1, 38% 2/3 και 19% 4. Η ανταπόκριση φαίνεται να είναι ταχύτερη και μεγαλύτερη σε ασθενείς με χαμηλότερο αρχικό ιικό φορτίο.

Σε ασθενείς με γονότυπο 2 ή 3, 24 εβδομάδες θεραπείας με PEG-IFN a 180 μg/εβδομαδιαίως σε συνδυασμό με ριμπαβιρίνη (800 mg/ημέρα) φαίνεται να είναι αρκετές ενώ για το γονότυπο 1 η θεραπεία έχει διάρκεια 48 εβδομάδων και η ριμπαβιρίνη χορηγείται σε δόση 1000 mg/ημέρα. Η μέτρηση του HCV RNA τη 12η εβδομάδα θεραπείας αποτελεί ένα δείκτη τελικής ανταπόκρισης στην αγωγή (EVR). Από τους ασθενείς με μείωση του ιικού φορτίου μικρότερη των 2 log την 12η εβδομάδα το >97% δεν θα ανταποκριθούν στη θεραπεία.

Σύμφωνα με νεότερα δεδομένα η μέτρηση του HCV RNA την 4η εβδομάδα θεραπείας είναι δείκτης ταχείας ιολογικής ανταπόκρισης (RVR) όταν το HCV RNA είναι αρνητικό με ευαίσθητη μέθοδο (28,29). Έτσι στο μέλλον θα υπάρχει εξατομίκευση της θεραπείας με βάση την κινητική του ιού (30), τη χρήση του δείκτη RVR την 4η και EVR τη 12η εβδομάδα, σε συνδυασμό με το γονότυπο το ιικό φορτίο και τα χαρακτηριστικά του ασθενή (πχ. μεταβολικό σύνδρομο, αλκοολισμός). Για παράδειγμα σε ασθενείς με γονότυπο 2/3 και RVR, 16 εβδομάδες θεραπείας και μικρότερη δόση ριμπαβιρίνης μπορεί να επαρκούν³¹.

Οι μοριακές μέθοδοι διάγνωσης αποτελούν εξετάσεις ρουτίνας για τις ιογενείς ηπατοπάθειες και η χρήση τους είναι συνεχώς αυξανόμενη.



Βιβλιογραφία

1. Feinstone SM., Kapikian AZ and Purcell RH. 1973. Hepatitis A detection by immune electron microscopy of a virus-like antigen associated with acute illness. *Science* 182:1026-1028.
2. Provost PJ and Hilleman MR. 1979. Propagation of human hepatitis A virus in cell culture in vivo. *Proc Soc Exp Biol Med* 160:213-221
3. Nainan OV, Xia G, Vaughan G and Margolis HS. 2006. Diagnosis of hepatitis A virus infection: a molecular approach. *Clin Microbiol Rev* 19:63-79
4. Tassopoulos NC, Papaevangelou GJ, Ticehurst JR and Purcell RH. 1986. Fecal excretion of Greek strains of hepatitis A virus in patients with hepatitis A and experimentally infected chimpanzees. *J Infect Dis* 154:231-237
5. Bower WA, Nainan OV, Han X, and Margolis HS. 2000. Duration of viremia in hepatitis A virus infection. *J Infect Dis* 182:12-17
6. Kao HW, Ashcavai M and Redeker AG. 1984. The persistence of hepatitis A IgM antibody after acute clinical hepatitis A. *Hepatology* 4:933-936
7. Sjogren MH, Hoke CH, Binn LN, Eckels KH, Dubois DR, Lyde L et al. 1991 Immunogenicity of an inactivated hepatitis A vaccine. *Ann Intern Med* 114:470-471
8. Lemon SM. 1993. Immunologic approaches to assessing the response to inactivated hepatitis A

- vaccine. *J Hepatol* 18 (Suppl 2):S15-19
9. Tuttleman JS, Purcel C, Summers J. 1986. Formation of the pool of covalently closed circular DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell* 47:451-60
 10. Hadziyannis SJ, Hadziyannis AS, Dourakis S, Alexopoulou A, Hosch A and Hess G. 1993. Clinical significance of quantitative anti-HBc IgM assay in acute and chronic HBV infection. *Hepato-Gastroenterol* 40:588-592
 11. Gerlich WH, Uy A, Lambrecht F, and Thomssen R. 1986. Cutoff levels of immunoglobulin M antibody against viral core antigen for differentiation of acute, chronic and past hepatitis B virus infections. *J Clin Microbiol* 24:288-293
 12. Knoll A, Hartmann A, Hamoshi H, Weislmaier K, Jilg W. 2006. Serological pattern “anti-HBc alone”: characterization of 552 individuals and clinical significance. *World J Gastroenterol*. 12(8):1255-60
 13. Wagner AA, Loustaud-Ratti V, Chemin I, Weinbreck P, Denis F, Alain S. 2005. Double hepatitis B virus infection in a patient with HIV/hepatitis C virus coinfection and ‘anti-HBc alone’ as serological pattern. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 24(9):623-7
 14. Chamorro AJ, Casado JL, Bellido D, Moreno S. Reactivation of hepatitis B in an HIV-infected patient with antibodies against hepatitis B core antigen as the only serological marker. 2005. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 24(7):492-4.
 15. Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ and Makris A. 1989. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet*. 2:588-91
 16. Brunetto MR, Giarin MM, Oliveri F, Chiaberge E, Baldi M, Alfarano A et al. 1991 Wild type and e antigen-minus hepatitis B viruses and course of chronic hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88:4186-90
 17. Buti M, Rodriguez-Frias F, Jardi R and Esteban R. 2005. Hepatitis B virus genome variability and disease progression: the impact of pre-core mutants and HBV genotypes. *J Clin Virol*. S1:S79-82
 18. Niesters. HGM, Pas S, de Man RA. 2005. Detection of hepatitis B virus genotypes and mutants: current status. *J Clin Virol*. S1:S4-8
 19. Locarnini S, Hatzakis A, Heathcote J, Keefe EB, Liang TJ, Mutimer D, Pawlotsky JM, Zoulim F. 2004. Management of antiviral resistance in patients with chronic hepatitis B. *Antivir Ther*. 9:679-93
 20. Lai CL, Dienstag J, Schiff E, Leung NW, Atkins M, Hunt C et al. 2003. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis*. 36:687-96
 21. Durantel D, Brunelle M, Grow E, Carrouee-Durantel S, Pichoud C, Villet S, Trepoc C and Zoulim F. 2005. Resistance of human hepatitis B virus to reverse transcriptase inhibitors: from genotypic to phenotypic testing. *J Clin Virol*. S1:S34-43
 22. Pawlotsky JM. 2005. The concept of hepatitis B virus mutant escape. *J Clin Virol*. S1:S125-129
 23. Podzorski RP. 2002 Molecular testing in the diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *Arch Pathol Lab Med*. Mar;126(3):285-90
 24. Dal Molin G, Tiribelli C, Campello C. 2003 A rational use of laboratory tests in the diagnosis and management of hepatitis C virus infection *Ann Hepatol*. Apr-Jun;2(2):76-83
 25. Trepoc, C. 2000. Genotype and viral load as prognostic indicators in the treatment of hepatitis C. *J Viral Hepat* 7: 250-257
 26. Zein, N.N. 2000. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev* 13: 223-235

27. Davis, G.L. 2002. Monitoring of viral levels during therapy of hepatitis C. *Hepatology* 36: S145-S151
28. Terrault NA, Pawlotsky JM, McHutchison J, Anderson F, Krajden M, Gordon S, Zitron I, Perrillo R, Gish R, Holodniy M, Friesenhahn M. 2005. Clinical utility of viral load measurements in individuals with chronic hepatitis C infection on antiviral therapy. *J Viral Hepat* 465-72, 1912.
29. Jensen DM, Morgan TR, Marcellin P, Pockros PJ, Reddy KR, Hadziyannis SJ, Ferenci P, Ackrill AM, Willems B. 2006. Early identification of HCV genotype 1 patients responding to 24 weeks peginterferon alpha-2a (40 kd)/ribavirin therapy *Hepatology* 43:954-960.
30. Zeuzem S, Pawlotsky JM, Lukasiewicz E, von Wagner M, Goulis I, Lurie Y, Gianfranco E, Vrolijk JM, Esteban JI, Hezode C, Lagging M, Negro F, Soulier A, Verheij-Hart E, Hansen B, Tal R, Ferrari C, Schalm SW, Neumann AU. 2005. International, multicenter, randomized, controlled study comparing dynamically individualized versus standard treatment in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 250-7
31. von Wagner M, Huber M, Berg T, Hinrichsen H, Rasenack J, Heintges T, Bergk A, Bernsmeier C, Haussinger D, Herrmann E, Zeuzem S. 2005. Peginterferon-alpha-2a (40KD) and ribavirin for 16 or 24 weeks in patients with genotype 2 or 3 chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 200\522-7, 129