

Χρόνια ηπατίτιδα C : συσχέτιση της παρουσίας αυτοαντισωμάτων με το γονότυπο του ιού C και το ιικό φορτίο

A. Καραντανά, Z. Τσίμτσιου, E. Γκίζα, Σ. Χριστοδούλου, A. Λίτα, I. Μαυρούδη, E. Ορφανού, M. Ραπτοπούλου-Γιγή

Δ' Παθολογική Κλινική ΑΠΘ, Ιπποκράτειο Γ.Π.Ν. Θεσσαλονίκη

Η λοίμωξη με τον ιό της ηπατίτιδας C διαπιστώθηκε ότι προάγει την εμφάνιση νοσημάτων αυτοάνοσης αιτιολογίας και σχετίζεται με παρουσία διαφόρων αυτοαντισωμάτων στον ορό. Με σκοπό να διερευνηθεί η συσχέτιση γονότυπου-ιικού φορτίου με την εμφάνιση αυτοαντισωμάτων στον ορό, σχεδιάστηκε η παρούσα μελέτη, στην οποία συμμετείχαν 26 ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C μέσης ηλικίας 34.2 έτη. Στους ασθενείς αυτούς μελετήθηκαν οι εξής παράμετροι : ANA, ASMA, AMA (μέθοδος έμμεσου ανοσοφθορισμού Hep-2), anti-LKM1 (ELISA), SSA, SSB, SM/RNP, Jo-1, Scl-70, Sm (μέθοδος ELISA), κρυσφαιρίνες (ποιοτικός προσδιορισμός), HCV-RNA (ποσοτική PCR), γονότυπος (INNOLIPA). Τα ευρήματά μας έδειξαν ότι θετι-

κά ANA είχαν 8 ασθενείς (30.76%), AMA 6(23.08%), ASMA 1 (3,85%), SSA 1 (3,85%), SSB 2 (7,69%), Sm 2 (7.69%), SM/RNP 2 (7.69%) και κρυσφαιρίνες 2 (7.69%). Τα anti-LKM-1 δεν ανιχνεύθηκαν σε κανέναν ασθενή. Διαπιστώθηκε ότι ο συχνότερος γονότυπος ήταν ο 3 (38.46%) και αυτό πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι οι περισσότεροι ασθενείς ήταν πρώην χρήστες ναρκωτικών. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχε συσχέτιση της παρουσίας αυτοαντισωμάτων με το γονότυπο του ιού C ή με το ιικό φορτίο. Κατά συνέπεια, συμπεραίνεται ότι ο ιός της ηπατίτιδας C διεγείρει αυτοάνοσες αντιδράσεις και ότι η διέγερση αυτή δε σχετίζεται με το γονότυπο και το ιικό φορτίο. *Ιπποκράτεια 1998, 2 (4):179-182*

Οι ιοί θεωρείται ότι εμπλέκονται στις αυτοάνοσες αντιδράσεις, είτε διεγείροντας την έναρξη μιας αυτοάνοσης αντίδρασης, είτε ενισχύοντας αυτοάνοσες εκδηλώσεις, που προϋπάρχουν της λοίμωξης με τον ιό. Ιδιαίτερα ενοχοποιούνται οι ιοί οι οποίοι μολύνουν και πολλαπλασιάζονται μέσα στα λεμφοκύτταρα, εκτός από το εκάστοτε όργανο "στόχος". Κατά συνέπεια, οι ιογενείς λοιμώξεις, οξείες ή χρόνιες, φαίνεται ότι μπορούν να προκαλέσουν, να επιταχύνουν ή να ενισχύσουν αυτοάνοσες απαντήσεις με αποτέλεσμα την εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων, μέσω του μηχανισμού της μοριακής μίμησης με αυτοαντιγόνα ή της σύνδεσης του ιού με ανθρώπινες πρωτεΐνες^{1,2}. Ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV), και ιδιαίτερα κατά τη χρόνια λοίμωξη, διαπιστώθηκε ότι προκαλεί ένα μεγάλο φάσμα αυτοάνοσων νοσημάτων. Επίσης, διεγείρει την παραγωγή διαφόρων μη οργανοειδικών αντισωμάτων, συνήθως σε χαμηλούς τίτλους και ανεξάρτητα από την ηλικία, το φύλο, τη βαρύτητα της ηπατικής νόσου και την απάντηση στη θεραπεία^{3,4}.

Η σημασία των αυτοαντισωμάτων αυτών στην πρόκληση αυτοάνοσης ηπατίτιδας συζητείται από τους διάφορους ερευνητές και ιδιαίτερα η παρουσία των αντιμικροσωματικών αντισωμάτων έναντι ήπατος-νεφρού (anti-LKM-1)⁵.

Με σκοπό να διερευνηθεί η συχνότητα των αυτοαντισωμάτων σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C στον Ελλαδικό χώρο και να συσχετισθεί η παρουσία τους με τον γονότυπο του HCV και το ιικό φορτίο σχεδιάστηκε η παρούσα μελέτη, στην

οποία συμμετείχαν 26 ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C.

Ασθενείς και Μέθοδοι

Ασθενείς : Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν 26 ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C (αυξημένες ALT, AST, antiHCV(+) (Elisa-RIBA), HCVRNA(+)), ηλικίας 20-52 ετών (μ.η. 34,2), 17 άνδρες και 9 γυναίκες. Ως πηγή λοίμωξης με τον HCV θεωρήθηκε η χρήση ενδοφλέβιων ναρκωτικών σε 20 ασθενείς, η μετάγγιση αίματος σε 4, ενώ σε 2 ασθενείς η πηγή μόλυνσης ήταν άγνωστη. Στην ομάδα των χρηστών, 18 (90%) ανέφεραν κοινή χρήση σύριγγας, 13 είχαν τατουάζ (65%) και 8 (40%) έκαναν κατάχρηση αλκοόλ (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C

| | |
|-----------------------|-------------------------|
| Ηλικία | 34.2 (διακ 20-52 έτη) |
| Ανδρες | 17 (65%) |
| Γυναίκες | 9 (35%) |
| Πηγή λοίμωξης: | |
| Χρήση ναρκωτικών | 20 (77%) |
| Μετάγγιση | 4 (15%) |
| Άγνωστη | 2 (8%) |

Μέθοδοι : Στους ασθενείς αυτούς, ο προσδιορισμός των anti-HCV έγινε με την τεχνική ELISA-2 και επιβεβαιώθηκε με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης (RIBA 3). ο ποσοτικός προσδιορι-

σμός του HCVRNA έγινε με τεχνική PCR (ποσοτική μέτρηση, AmpliCor) και ο προσδιορισμός του γονότυπου του ιού C με τη μέθοδο INNOLIPA.

Στους ασθενείς αυτούς προσδιορίστηκαν τα εξής αυτοαντισώματα :

A. 1) ANA (αντιπυρηνικά) 2) AMA (αντιμιτοχονδριακά) 3) SMA (αντι-λειών μυικών ινών) με την τεχνική του εμμέσου ανοσοφθορισμού (Her-2).

B. 4) anti-LKM-1 (αντισώματα έναντι μικροσωμάτων ήπατος/νεφρού) με τη μέθοδο ELISA

Γ. 5) SSA, 6) SSB, 7) Sm/RNP, 8) Sm, 9) Jo-1, 10) Scl-70 με τη μέθοδο ELISA

Επίσης στους ασθενείς έγινε ποιοτική ανίχνευση κρυσφαιρινών

Αποτελέσματα

Η παρουσία θετικών αυτοαντισωμάτων και κρυσφαιρινών, όπως και η συσχέτισή τους με τον γονότυπο του HCV, φαίνονται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2. Παρουσία θετικών αυτοαντισωμάτων, κρυσφαιρινών και γονότυπος του HCV

| Αυτοαντισώματα | Γονότυπος |
|---------------------|-----------|
| 1. ANA+AMA | 3a |
| 2. ANA+AMA+ASMA | 1b |
| 3. ANA+AMA | 1b |
| 4. ANA+AMA | 1b |
| 5. ANA | 3 |
| 6. ANA+SSB | 4 |
| 7. ANA+AMA+SSB | 3,4 |
| 8. ANA+AMA | 4 |
| 9. SM/RNP | 1a |
| 10. SM+SM/RNP+SSA | 3a |
| 11. SM | 1a |
| Κρυσφαιρίνες | |
| 1 | 1a |
| 2. | 1a |

Διαπιστώθηκε ότι θετικά αυτοαντισώματα είχαν 11 ασθενείς (42.6%). Τα ANA ήταν θετικά στο μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών (8/11, 72.7%), ενώ τα υπόλοιπα αντισώματα ήταν θετικά : AMA 6/11 (54.5%), SMA 1/11 (9.09%), SSA 1/11 (9.09%), SSB 2/11 (18.9%), Sm 2/11 (18.9%), Sm/RNP 2/11 (18.9%).

Επίσης διαπιστώθηκε ότι 8/11 ασθενείς είχαν περισσότερα από ένα είδος αυτοαντισωμάτων θετικά (72.7%). Αξίζει να σημειωθεί ότι 7/8 ασθε-

νείς με θετικά ANA είχαν εικόνα σπικτικού ανοσοφθορισμού και μόνον 1 από αυτούς είχε θετικά ANA σε τίτλο μέχρι 1:160. Δεν ανιχνεύθηκαν anti-LKM-1 αντισώματα σε κανέναν ασθενή.

Όσον αφορά την κατανομή των γονοτύπων του ιού C (πίνακας 3), διαπιστώθηκε ότι ο συχνότερος γονότυπος ήταν ο γονότυπος 3. Δύο ασθενείς παρουσίαζαν κρυσφαιρίνες (17.69%).

Πίνακας 3. Κατανομή γονοτύπων του HCV στους ασθενείς

| Γονότυπος | Ασθενείς | % |
|-----------|----------|-------|
| 1a | 3 | 11,54 |
| 1b | 7 | 26,92 |
| 3 | 10 | 38,46 |
| 4 | 4 | 15,38 |
| 3+4 | 2 | 7,69 |

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων δε φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση θετικών αυτοαντισωμάτων και ιικού φορτίου ή γονότυπου του ιού C. Εντούτοις θα πρέπει να σημειωθεί ότι 2/3 ασθενείς με γονότυπο 1a παρουσίαζαν Sm/RNP ή Sm(+) και στους ασθενείς αυτούς ανιχνεύθηκαν και κρυσφαιρίνες. Επίσης, 3/6 (50%) με γονότυπο 4 (ο ένας από αυτούς είχε συν-λοίμωξη με τον γονότυπο 3) είχαν θετικά αυτοαντισώματα, δύο από τους οποίους είχαν ANA+SSB θετικά.

Συζήτηση

Από την ανάλυση των γονοτύπων του HCV στους ασθενείς, διαπιστώθηκε ότι ο συχνότερος γονότυπος ήταν ο γονότυπος 3 (10/26). Επιπλέον των 10 αυτών ασθενών, άλλοι 2 είχαν λοίμωξη με δύο γονότυπους (3 και 4). Το γεγονός αυτό πιθανόν οφείλεται στο ότι οι περισσότεροι ασθενείς (20/26) ήταν πρώην χρήστες ναρκωτικών. Στην ομάδα αυτή αναφέρεται ότι η λοίμωξη οφείλεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στο γονότυπο 3, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους ασθενείς που στη χώρα μας η λοίμωξη διαπιστώθηκε ότι οφείλεται πιο συχνά στο γονότυπο 1β⁶.

Από τα αποτελέσματα της αναζήτησης αυτοαντισωμάτων, στην παρούσα μελέτη, διαπιστώθηκε ότι ήταν θετικά σε ένα υψηλό ποσοστό των ασθενών (42.6%). Ακόμη, διαπιστώθηκε ότι οι περισσότεροι ασθενείς είχαν ANA θετικά, με εικόνα σπικτικού φθορισμού, την οποία δίνουν αντισώματα που στρέφονται έναντι της RNP (ριβονουκλεοπρωτεϊνης). Τρεις επιπλέον ασθενείς είχαν αντισώματα που στρέφονταν έναντι άλλων πυρηνικών αντιγόνων (Sm, Sm/RNP, SSA, SSB). AMA και SMA θετικά βρέθηκαν σε μικρότερη α-

ναλογία ασθενών (6 στην πρώτη περίπτωση και 1 στη δεύτερη) και πάντα με ANA (+).

Η παρουσία των αντισωμάτων αυτών ήταν σε χαμηλούς τίτλους και δεν συνοδεύονταν από κάποια κλινική εκδήλωση στους ασθενείς. Τα ευρήματα αυτά αρχικά φαίνεται να μη συμφωνούν με άλλες μελέτες, στις οποίες διαπιστώθηκε ότι ANA και SMA θετικά, που χαρακτηρίζουν την αυτοάνοση ηπατίτιδα τύπου 1, ανευρίσκονται σπάνια σε ασθενείς με HCV λοίμωξη^{7,8}, ίσως εκτός από τις περιοχές με υψηλή ενδημικότητα της HCV λοίμωξης⁹. Εντούτοις όμως τα θετικά αντισώματα, στην παρούσα μελέτη, ήταν σε χαμηλούς τίτλους, χωρίς κλινική εικόνα αυτοάνοσης ηπατίτιδας και κατά συνέπεια δε θα πρέπει να θεωρηθεί ότι η παρουσία τους ενοχοποιεί τον HCV ως βασικό παράγοντα πρόκλησης αυτοάνοσης ηπατίτιδας τύπου 1.

Όσον αφορά τα anti-LKM-1 αντισώματα, δεν ανιχνεύθηκαν σε κανέναν ασθενή της παρούσας μελέτης. Τα θετικά anti-LKM-1 αντισώματα στην χρόνια ηπατίτιδα C, χαρακτηρίζουν έναν ιδιαίτερο τύπο αυτοάνοσης ηπατίτιδας (2β), στον οποίο η παρουσία της ηπατικής νόσου αποδίδεται στον ιό, ενώ η παρουσία των anti-LKM-1 σε εμφανιζόμενο που οφείλεται σε παραγωγή αυτοαντισωμάτων λόγω μοριακής μίμησης του HCV και του P450IID6 (αντιγόνο έναντι του οποίου στρέφονται τα anti-LKM-1)¹⁰⁻¹¹.

Η συχνότητα των anti-LKM-1 στη χρόνια HCV λοίμωξη αναφέρεται ότι κυμαίνεται από 0-7% ανάλογα με τη γεωγραφική προέλευση των ασθενών². Τα αντισώματα αυτά δε σχετίζονται με το γονότυπο του ιού, αλλά ανευρίσκονται συχνότερα σε ασθενείς με χαμηλό ιικό φορτίο¹²⁻¹³.

Ο επιπολασμός των κρυσφαιρινών στη χρόνια ηπατίτιδα C αναφέρεται ότι είναι πολύ υψηλός, 36-54.3%, και φαίνεται ότι αποτελεί την κυριότερη εξωηπατική εκδήλωση της νόσου¹⁴. Παρόλα αυτά, κλινικές εκδηλώσεις αναφέρονται μόνον σε ένα πολύ μικρό ποσοστό των ασθενών⁵. Στους δικούς μας ασθενείς παρουσία κρυσφαιρινών διαπιστώθηκε σε χαμηλό ποσοστό 2/26 (7.69%). Οι ασθενείς δεν είχαν καμία κλινική εκδήλωση.

Όσο αφορά την ανάλυση των ευρημάτων σχετικά με την παρουσία θετικών αυτοαντισωμάτων και γονότυπου του HCV, δε διαπιστώθηκε εμφανής συσχέτιση στους ασθενείς μας. Εντούτοις θα πρέπει να σημειωθεί ότι 3/6 ασθενείς με λοίμωξη από το γονότυπο 4 (στον ένα από τους οποίους συνυπήρχε και ο γονότυπος 3) είχαν ANA θετικά και επιπλέον ένας είχε και AMA (+), ο

δεύτερος AMA+SSB και ο τρίτος και SSB (+). Ακόμη θα πρέπει να τονισθεί ότι και οι 2 ασθενείς με θετικές κρυσφαιρίνες είχαν λοίμωξη με το γονότυπο 1α, όπως επίσης και ότι 2/3 ασθενείς με γονότυπο 1α είχαν Sm και Sm/RNP (+).

Δε διαπιστώθηκε συσχέτιση παρουσίας αυτοαντισωμάτων με το ιικό φορτίο. Εντούτοις όλοι οι ασθενείς είχαν χαμηλό ιικό φορτίο $<1 \times 10^6$ αντίγραφα/ml. Χαμηλή ιαιμία σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C και ANA θετικά αναφέρεται και από άλλους ερευνητές¹⁵ και μάλιστα η παρουσία τους ενοχοποιείται ως ένας επιπρόσθετος παράγοντας, που συμβάλλει στην ηπατική βλάβη¹².

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η αυξημένη συχνότητα αυτοαντισωμάτων έναντι πυρηνικών αντιγόνων σε χαμηλούς τίτλους χωρίς κλινικές εκδηλώσεις δε θα πρέπει να εμπλέκεται σε μηχανισμούς αυτοάνοσης ηπατίτιδας στη χρόνια ηπατίτιδα C. Επιπλέον, το αρχικό έναυσμα της πρόκλησης αυτών των αυτοαντισωμάτων φαίνεται ότι είναι η ιογενής λοίμωξη καθαυτή, διότι δε διαπιστώθηκε συσχέτιση της παρουσίας των αντισωμάτων με το γονότυπο του HCV ή τα επίπεδα του HCVRNA.

ABSTRACT

Karantana A., Tsimtsiou Z., Giza E., Christodoulou S., Lita A., Mavroudi I., Orfanou E., Raptopoulou - Gigi M. Chronic hepatitis C : Autoantibodies and their correlation to HCV genotype and viraemia. Hippokratia, 1998, 2(4):179-182

Infection with hepatitis C virus has been found to enhance autoimmune responses and is associated with the presence of various autoantibodies in serum. This study was scheduled in order to investigate the correlation of serum autoantibodies to HCV genotype and viraemia. Twenty-six patients with a mean age of 34.2 years participated in the study. The following parameters were tested : ANA, AMA, ASMA (indirect immunofluorescence Hep-2), anti-LKM-1 (ELISA), Sm, Sm/RNP, SSA, SSB, Jo-1 and Scl 70 (ELISA), cryoglobulins (qualitative assessment), HCV-RNA (quantitative PCR), HCV genotype (INNOLIPA). Our findings showed that 8 patients (30.76%) had positive ANA, 6 had AMA (23.08%), ASMA 1(3,85%), SSA 1(3,85%), SSB 2(7,69%), Sm 2(7,69%), Sm/RNP 2(7,69%) and cryoglobulins 2(7,69%). The anti-LKM-1 were not detected in any of the patients. The most common genotype was found to be 3a; this is

probably due to the fact that most patients were ex-drug addicts. No correlation among positive autoantibodies and HCV genotype or viral load was noticed. These results suggest that hepatitis C virus per se induces autoimmune responses and that the enhancement of these responses is not directly related to the genotype or the levels of HCVRNA.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Gerken G. Autoimmune phenomena in viral hepatitis. In : 5ο Ηπατολογικό Συνέδριο : Διαλέξεις-Στρογγυλές Τράπεζες. Δ. Τσαντούλας, Εκδότης. Αθήνα 1997. 17-19
2. Manns MP, Obermayer-Straub P. Viral induction of autoimmunity : mechanisms and examples in hepatology. J Vir Hepatitis 1997, 4(Suppl 2) : 42-47
3. Czaja AJ, Carpenter HA, Santrach PJ, Moore SB, Taswell HF, Homburger HA. Evidence against hepatitis viruses as important causes of severe autoimmune hepatitis in the United States. J Hepatol 1993, 18:342-352
4. Clifford B, Donahue D, Smith L et al. High prevalence of serological markers of autoimmunity in patients with chronic hepatitis C. Hepatolgy 1995, 21 : 613-619
5. Eddleston ALW. Hepatitis C infection and autoimmunity. J Hepatol 1996, 24 (Suppl 2) : 55-60
6. Χατζάκης Α, Κατσουλίδου Α. Η μοριακή επιδημιολογία της HCV λοιμώξεως υπό το πρίσμα των γονοτύπων. Ηπατίτιδα C 1997. Σ.Ι. Χατζηγιάννης, Αθήνα 1997, σελ. 21-28
7. Koskinas J, McFarlane B, Nouri-Aria K, et al. Cellular and humoral immune reactions against autoantigens and hepatitis C viral antigens. Gastroenterology 1994, 107: 1436-1442
8. Pawlotsky J-M, Deforges L, Bretagne S, et al. Hepatitis C virus infection can mimic type -I (antinuclear antibody positive) autoimmune chronic active hepatitis. Gut 1993, Suppl: S66-S68
9. Χατζηγιάννης ΣΙ, Γκουτσόζι Η. Το φάσμα και η παθογένεια των εξωηπατικών εκδηλώσεων της HCV λοιμώξεως. Ηπατίτιδα C 1996. Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα 1996. 62-81
10. Magrin S, Craxi A, Fabiano C, et al. Hepatitis C virus replication in autoimmune chronic hepatitis. J Hepatol 1991, 13 : 364-367
11. Guegen M, Boniface O, Bernand O, et al. Identification of the main epitope on human cytochrome P450IID6 recognized by anti-liver-kidney microsomal antigen. Autoimmunity 1991, 4:607-615
12. Giostra F, Manzini A, Lenzi M, et al. Low hepatitis C viremia levels in patients with anti-liver/kidney microsomal antibody type I positive chronic hepatitis. J Hepatol 1996. 25:433-438
13. Michitaka K, Durazzo M, Tillmann HL, Walker D, Phillip T, Manns MP. Analysis of hepatitis C virus genome in patients with autoimmune hepatitis type 2. Gastroenterology 1994, 106:1603-1610
14. Lunel F, Musset L, Cacoub P, et al. Cryoglobulinaemia in chronic liver disease. Role of hepatitis C virus and liver damage. Gastroenterology 1994, 106:1021-1300
15. Lau JY, Davis GL, Kniffen J, et al. Significance of serum hepatitis C RNA levels in chronic hepatitis C. Lancet 1993, 341:1501-1504

Αλληλογραφία:

Μ. Ραπτοπούλου-Γιγή
Δ' Παθολογική Κλινική ΑΠΘ
Ιπποκράτειο ΓΠΝ
Θεσσαλονίκη

Corresponding author:

Raptopoulou-Gigi M
4th Medical Dept,
Aristotelian University,
Hippokration Hospital,
Thessaloniki, Greece.