

Η κλινική σημασία της παρουσίας του αυστραλιανού αντιγόνου στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα των HBsAg(+)/HBeAg(-) επιτόκων

Παπαδάκης Μιλτιάδης¹, Δασκαλάκης Γεώργιος¹, Βλάχος Γεώργιος¹, Ελευσινιώτης Ιωάννης², Αντσακλής Αριστείδης¹

¹Α' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Παν/μίου Αθηνών, Νοσοκομείο «Αλεξάνδρα»

²Παθολογική Κλινική - Ηπατολογικό Ιατρείο Νοσηλευτικού Τμήματος του Παν/μίου Αθηνών, Νοσοκομείο «Έλενα Βενιζέλου»

Αλληλογραφία: Μιλτιάδης Παπαδάκης, Θεμιστοκλέους 48, 16674 Γλυφάδα

Τηλ.: 210-8949444 & 6977629996

E-mail: miltospapadakis@yahoo.com

Περίληψη

Η κάθετη μετάδοση του ιού της ηπατίτιδας Β κατά την περιγεννητική περίοδο είναι η πρωταρχική αιτία μετάδοσης του HBV σε ενδημικές περιοχές. Ο βασικός τρόπος μετάδοσης του ιού της ηπατίτιδας Β από τις οροθετικές μητέρες στα νεογνά τους είναι η μετάδοση κατά την περιγεννητική περίοδο. Σκοπός της μελέτης είναι να αξιολογηθεί η σημασία του ορολογικού και ιολογικού προφίλ του ομφαλοπλακουντιακού αίματος κατά τον τοκετό των HBsAg(+)/HBeAg(-) επιτόκων και να διερευνηθεί η πιθανή συσχέτισή του με την περιγεννητική μετάδοση του ιού της ηπατίτιδας Β. Από πενήντα (50) επίτοκες που έπασχαν από χρόνια ηπατίτιδα Β ελήφθη δείγμα του ομφαλοπλακουντιακού αίματος κατά τη διάρκεια του τοκετού το οποίο μελετήθηκε ορολογικά και ιολογικά για τον HBV. Επίσης, ελήφθη δείγμα αίματος και από τα νεογνά το 1ο και 3ο 24ωρο της ζωής τους το οποίο εξετάστηκε ιολογικά για τον HBV. Τέλος ελήφθη τμήμα του πλακούντα μετά το πέρας του τοκετού και εξετάστηκε για την παρουσία του HBsAg και HBeAg. Επανεκτίμηση του ιολογικού προφίλ του ορού των νεογνών έγινε σε ηλικία 12 μηνών. Το HBsAg ανιχνεύτηκε στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα 16 επιτόκων, ενώ τα HBeAg και anti-HBs δεν ανιχνεύτηκαν στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα καμμιάς επιτόκου. Επίσης, HBV-DNA δεν ανιχνεύτηκε στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα καμμιάς από τις 50 επιτόκους. HBsAg και HBV-DNA δεν ανιχνεύτηκαν σε κανένα πλακούντα, ενώ το HBeAg ανιχνεύτηκε σε 16 εξ αυτών. Ο HBV δεν μεταδόθηκε περιγεννητικά σε κανένα νεογνό. Συμπερασματικά, το HBsAg δύναται να διαπεράσει τον πλακουντιακό φραγμό όπως συνέβη στο ένα τρίτο (1/3) περίπου των HBsAg (+)/HBeAg (-) επιτόκων της παρούσας μελέτης ανεξαρτήτως του τίτλου του HBV-DNA στον ορό τους, του τρόπου του τοκετού ή της ανίχνευσης του HBV στον πλακούντα τους. Η κλινική συσχέτιση αυτού του γεγονότος με την ενδομήτρια ή διαπλακουντιακή μετάδοση του ιού της ηπατίτιδας Β δε φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντική.

Λέξεις κλειδιά: Αυστραλιανό αντιγόνο, ομφαλοπλακουντιακό αίμα, ιός της ηπατίτιδας Β, κάθετη μετάδοση

Εισαγωγή

Η επίπτωση του αυστραλιανού αντιγόνου στις Ελληνίδες γυναίκες που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία είναι πολύ χαμηλή και η μεγάλη πλειοψηφία των HBsAg(+) γυναικών (>95%) είναι HBeAg οροαρνητικές¹. Παρά ταύτα όμως το ένα τρίτο από αυτές εμφανίζει στον ορό του υψηλό τίτλο HBV-DNA², γεγονός που ερμηνεύεται από την ύπαρξη προπυρηνικής μετάλλαξης (G1896A) στο γένωμα του HBV^{3,4}.

Η κάθετη μετάδοση του ιού της ηπατίτιδας Β κατά την περιγεννητική περίοδο αποτελεί την πρωταρχική αιτία μετάδοσης του HBV σε ενδημικές περιοχές⁵. Ο βασικός τρόπος μετάδοσης του ιού της ηπατίτιδας Β από τις οροθετικές μητέρες στα νεογνά τους είναι η μετάδοση κατά την περιγεννητική περίοδο. Επιπροσθέτως, σε ένα μικρό ποσοστό νεογνών που γεννιούνται από μητέρες με υψηλή μολυσματικότητα, ελλοχεύει ο κίνδυνος της ενδομήτριας ή διαπλακουντιακής διασποράς της λοίμωξης, η οποία και καθιστά αναποτελεσματική κάθε μορφή ανοσοπροφύλαξης μετά τον τοκετό. Αυτή η μορφή διασποράς αφορά κυρίως τα νεογνά που γεννιούνται από HBsAg(+)/HBeAg(+) μητέρες με πολύ υψηλά επίπεδα αιμίας (HBV-DNA) στον ορό τους κατά την περιγεννητική περίοδο και συσχετίζεται με τη λοίμωξη των ενδοθηλιακών και τροφοβλαστικών κυττάρων του πλακούντα και την παρουσία του HBV-DNA στο αίμα του ομφάλιου λώρου^{5,6}.

Τα δεδομένα που αφορούν το ορολογικό και ιολογικό προφίλ του ομφαλοπλακουντιακού αίματος καθώς και την ανοσοϊστοχημεία του πλακούντα των HBeAg(-) επιτόκων που είναι χρόνιοι φορείς του ιού της ηπατίτιδας Β HBV στην Ευρώπη, είναι ελλιπή.

Σκοπός της Μελέτης

Σκοπός της μελέτης είναι να αξιολογηθεί η σημασία του ορολογικού και ιολογικού προφίλ του ομφαλοπλακουντιακού αίματος κατά τον τοκετό των HBsAg(+)/HBeAg(-) επιτόκων και να διερευνηθεί η πιθανή συσχέτιση αυτού με την περιγεννητική μετάδοση του ιού της ηπατίτιδας Β και την αποτυχία του σχήματος της ενεργητικής και της παθητικής ανοσοποίησης των νεογνών τους.

Ασθενείς και Μέθοδος

Ελήφθησαν δείγματα ορού από 50 επίτοκες που έπασχαν από χρόνια ηπατίτιδα Β και που γέννησαν στην Α' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Παν/μίου Αθηνών στο Μαιευτήριο του Νοσοκομείου «Αλεξάνδρα» όπως επίσης και δείγματα του ομ-

φαλοπλακουντιακού αίματος αυτών κατά τη διάρκεια του τοκετού τα οποία μελετήθηκαν ορολογικά και ιολογικά για τον HBV.

Επίσης, ελήφθη δείγμα αίματος και από τα νεογνά το 1ο και 3ο 24ωρο της ζωής τους το οποίο εξετάστηκε ιολογικά για τον HBV. Τέλος, ελήφθη τμήμα του πλακούντα μετά το πέρας του τοκετού και εξετάστηκε ανοσοϊστοχημικά για την παρουσία των HBsAg και HBeAg. Επανεκτίμηση του ιολογικού προφίλ του ορού των νεογνών έγινε σε ηλικία 12 μηνών. Για την τεκμηρίωση πιθανής περιγεννητικής μετάδοσης του HBV εξετάστηκε δείγμα αίματος των νεογνών σε ηλικία 6 και 12 μηνών προκειμένου να ανιχνευτεί ιικό φορτίο (HBV-DNA). Οι ορολογικοί δείκτες εξετάστηκαν με τις μεθόδους ενζυμικής ανοσομέτρησης (COBAS AmpliCor II, Roche), το HBV-DNA του ορού και του ομφαλοπλακουντιακού αίματος μετρήθηκε με τη χρησιμοποίηση μεθόδου ποσοτικού PCR (AmpliCor/Roche), ενώ η ανίχνευση του HBV-DNA στον πλακουντιακό ιστό έγινε με real time PCR μέθοδο. Η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των HBsAg και HBeAg έγινε με την εφαρμογή της Envision HRP μεθόδου. Το anti-HBs αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού (Κλώνος 3E7) σε αραιώση 1:50, ενώ το anti-HBeAg ήταν πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελίου σε αραιώση 1:500.

Ως θετικό control δείγμα ιστού χρησιμοποιήθηκε τμήμα ηπατικού ιστού ασθενούς με χρόνια ηπατίτιδα Β που είχε ληφθεί με ηπατική βιοψία, ενώ ως αρνητικό control δείγμα ιστού χρησιμοποιήθηκε πλακουντιακός ιστός επιτόκου που δεν είχε μολυνθεί από τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBsAg οροαρνητική, HBeAg οροαρνητική, anti-HBe οροαρνητική, anti-HBe οροαρνητική).

Η στατιστική ανάλυση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο SPSS V11 (Chicago ILL). Στατιστικά σημαντική συσχέτιση θεωρήθηκε όταν το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας p ήταν μικρότερο του 0.05 ($p < 0.05$).

Αποτελέσματα

Οι 22 από τις 50 επίτοκες (44%) γέννησαν με Καισαρική τομή και οι 28 (56%) γέννησαν με φυσιολογικό τοκετό. Κατά την περιγεννητική περίοδο στον ορό 22 επιτόκων (44%) ανιχνεύθηκε ιικό φορτίο, στον ορό 28 εξ αυτών (56%) το HBV-DNA ήταν μη ανιχνεύσιμο (<400 copies/ml), ενώ τέσσερις από τις 22 είχαν υψηλό ιικό φορτίο (>10000 copies/ml).

Το HBsAg ανιχνεύθηκε στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα 16 επιτόκων, ενώ τα HBeAg και anti-HBs δεν

Πίνακας 1: Ιολογικά και ορολογικά δεδομένα που προκύπτουν από τη μελέτη του ορού των επιτόκων, του ομφαλοπλακουντιακού αίματος και την ανοσοϊστοχημική μελέτη των πλακουντιακών ιστών.

Δείγματα ορού επιτόκων (n = 50)	
HBV-DNA οροθετικό	22/50 (44%)
HBV-DNA οροαρνητικό	28/50 (56%)
Δείγματα ομφαλοπλακουντιακού αίματος (n = 50)	
HBsAg θετικά	16/50 (32%)
Anti-HBc θετικά	50/50 (100%)
Anti-HBe θετικά	50/50 (100%)
HBV-DNA θετικά	0/50 (0%)
Δείγματα πλακουντιακού ιστού (n = 50)	
HBsAg θετικά	0/50 (0%)
HBcAg θετικά	16/50 (32%)

ανιχνεύτηκαν στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα καμιάς επιτόκου. Anti-HBe και anti-HBc ανιχνεύτηκαν στο σύνολο του ομφαλοπλακουντιακού αίματος των επιτόκων. Από τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων αυτών δεν προκύπτει συσχέτιση μεταξύ της ιαμίας των επιτόκων και της παρουσίας του αυστραλιανού αντιγόνου στο ομφαλοπλακουντιακό τους αίμα ($p=0.761$). Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι δεν ανιχνεύτηκε HBV-DNA στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα καμιάς από τις 50 επιτόκους. Τα ιολογικά και ορολογικά δεδομένα που προκύπτουν από τη μελέτη του ορού και του ομφαλοπλακουντιακού αίματος των 50 επιτόκων απεικονίζονται στον πίνακα 1.

Οι πλακούντες των 50 επιτόκων εξετάστηκαν για την ανίχνευση του HBsAg και του HBcAg και όλοι τους ήταν HBsAg(-), ενώ οι 16 (32%) ήταν HBcAg(+) ανεξαρτήτως της παρουσίας ή απουσίας ιαμίας στον ορό τους (Εικόνα 1). Και τα 50 νεογνά που εξετάστηκαν το 1ο και το 3ο 24ωρο της ζωής τους ήταν HBV-DNA(-) και σε κανένα από αυτά δεν μεταδόθηκε περιγεννητικά ο ιός της ηπατίτιδας Β.

Συζήτηση-Συμπεράσματα

Τα δεδομένα από τη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με το ιολογικό και το ορολογικό προφίλ του ομφαλοπλακουντιακού αίματος καθώς και την προσβολή του πλακούντα από τα αντιγόνα του HBV στις HBeAg οροαρνητικές επίτοκες που πάσχουν από χρόνια ηπατίτιδα Β, είναι ανεπαρκή.

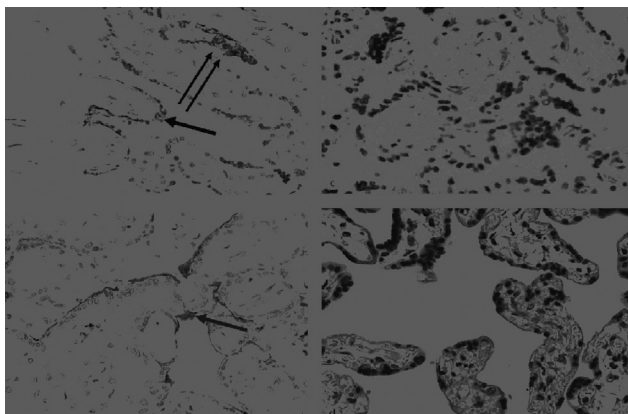
Από την ανάλυση των δεδομένων της παρούσας μελέτης προκύπτει ότι σε κανένα από τα 50 νεογνά δεν απέτυχε το σχήμα ενεργητικής και παθητικής ανοσοποίησης και δε μεταδόθηκε περιγεννητικά ο HBV. Το ως άνω στοιχείο τεκμηριώθηκε αφού και

τα 50 νεογνά, άλλα με τη συμπλήρωση του 2ου έτους της ζωής τους και άλλα νωρίτερα, εμφάνισαν το ακόλουθο ορολογικό και ιολογικό προφίλ: HBsAg(-), HBeAg(-), anti-HBe(-), anti-HBc(-), anti-HBs(+) και ταυτόχρονα HBV-DNA(-).

Επίσης, στην παρούσα μελέτη, ο τρόπος διεκπεραίωσης του τοκετού (καισαρική τομή ή τοκετός δια της φυσιολογικής οδού) δεν έπαιξε κανένα ρόλο στην πιθανότητα περιγεννητικής μετάδοσης του HBV.

Η ενδομήτρια μετάδοση του HBV είναι στενά συνδεδεμένη με την HBeAg οροθετικότητα των επιτόκων, τα υψηλά επίπεδα ιαμίας τους και την προσβολή του πλακουντιακού ιστού τους από τον ιό της ηπατίτιδας Β κυρίως μέσω της λοίμωξης των ενδοθηλιακών κυττάρων των τριχοειδών των λαχνών του πλακούντα^{5,6}. Είναι επαρκώς τεκμηριωμένο ότι το HBeAg μπορεί να περάσει στον πλακούντα είτε μέσω πλακουντιακής διαφυγής είτε μέσω της μεταφοράς του από «κύτταρο σε κύτταρο» του πλακούντα^{6,7}. Πιθανολογείται ότι η προσβολή του πλακούντα από το HBeAg παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην διαπλακουντιακή μετάδοση του HBV⁶. Αντίστοιχα, η απουσία της έκφρασης του HBeAg συσχετίζεται με σαφώς μικρότερο κίνδυνο για ενδομήτρια ή διαπλακουντιακή μετάδοση του HBV και αυτό πιθανώς οφείλεται είτε στο χαμηλότερο τίτλο αναπαραγωγής του HBV (HBV-DNA) που συνήθως παρατηρείται συχνότερα στις HBeAg οροαρνητικές επίτοκες με χρόνια ηπατίτιδα Β σε σχέση με τις HBeAg οροθετικές, είτε σε ανοσολογικές παραμέτρους που σχετίζονται με την απουσία του HBeAg.

Αναφορικά με τις 50 επίτοκες της παρούσας μελέτης, όλες ήταν HBeAg οροαρνητικές χρόνιες φορείς του ιού της ηπατίτιδας Β. Όπως προαναφέρθηκε, στον ορό 22 επιτόκων (44%) ανιχνεύθηκε ι-



Εικόνα 1 (a,b): Ανοσοϊστοχημική αντίγνωση του HBsAg στον πλακουντιακό ιστό επιτόκων της μελέτης (τα βέλη δείχνουν έντονη θετικότητα), (c): HBsAg(-) πλακουντιακός ιστός, (d): HBsAg(-) πλακουντιακός ιστός (δέγμα control).

κό φορτίο. Ο τίτλος του HBV-DNA δε συσχετίστηκε με ενδομήτρια ή διαπλακουντιακή μετάδοση του ιού ανεξαρτήτως της παρουσίας προπυρηνικής μετάλλαξης (G1896A) στο γένωμα του HBV, στο 44% των επιτόκων της μελέτης.

Δεκαέξι επίτοκες (32%) εμφάνισαν το HBsAg στο ομφαλοπλακουντιακό τους αίμα ενώ τα HBeAg και anti-HBs δεν ανιχνεύτηκαν στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα καμιάς εξ αυτών. Στο σύνολο του ομφαλοπλακουντιακού αίματος των επιτόκων ανιχνεύτηκαν anti-HBe και anti-HBc. Από τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων αυτών δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της αιμιάς των επιτόκων και της παρουσίας του αυστραλιανού αντιγόνου στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα αυτών ($p=0.761$). Δεν ανιχνεύτηκε HBV-DNA στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα καμιάς από τις 50 επιτόκους. Η παρουσία του HBsAg στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα δε συσχετίστηκε με το είδος του τοκετού ($p=0.559$) ή τον υψηλό τίτλο HBV-DNA στον ορό των επιτόκων ($p=0.675$). Επίσης, ο τρόπος τοκετού δε φαίνεται να σχετίζεται με τα αντισώματα του HBV στον πλακούντα. Συνεπώς, το HBsAg δύναται να διαπεράσει τον πλακουντιακό φραγμό όπως συνέβη στο ένα τρίτο (1/3) περίπου των HBsAg (+)/HBeAg (-) επιτόκων της παρούσας μελέτης ανεξάρτητα από τον τίτλο του HBV-DNA στον ορό τους, τον τρόπο του τοκετού ή την ανίχνευση του HBV στον πλακούντα τους. Η κλινική συσχέτιση αυτού του γεγονότος με την ενδομήτρια ή διαπλακουντιακή μετάδοση του ιού της ηπατίτιδας Β και την αποτυχία του σχήματος της ενεργητικής και παθητικής ανοσοπροφύλαξης των νεογνών δε φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντική.

Clinical significance of surface anti-gen's presence in cord blood of HBSaG(+)/HBeAG(-) mothers

Papadakis M.¹, Daskalakis G.¹, Vlachos G.¹, Elefsiniotis I.², Antsaklis A.¹

¹First Department of Obstetrics and Gynecology, University of Athens, 'Alexandra' Hospital and

²Department of Internal Medicine-Hepatology and Infectious Diseases Unit, 'Elena Venizelou' Hospital, University of Athens, Athens, Greece

Correspondence: Miltiadis Papadakis

48 Themistokleous str., 16674 Glyfada,

Athens, Greece

Tel.: +302108949444 & +306977629996

E-mail: miltospapadakis@yahoo.com

Summary

Vertical transmission of hepatitis B virus (HBV) infection during the perinatal period is the main cause of HBV transmission in endemic countries. In countries of high HBV prevalence, intrauterine/transplacental transmission is observed in a significant proportion of pregnancies, resulting in failure of passive-active immunoprophylaxis schedule and dissemination of HBV infection. The aim of our study was to evaluate the serological and virological profiles of HBV infection in cord blood samples obtained from HBeAg-negative chronic HBV-infected women, at delivery, and to investigate their relationship with the clinical outcome (possible transmission of HBV) in neonates who were receiving the currently approved passive-active immunoprophylaxis schedule. Fifty (50) HBsAg (+)/HBeAg (-) pregnant women and their neonates were serologically and virologically tested for HBV. Cord blood was obtained at the time of delivery and was serologically and virologically tested. Serum samples were collected from all the neonates (at the first day of life, before the initiation of the immunoprophylaxis schedule and at the third day of life) for virological testing. Moreover, immunohistochemical staining for HBsAg and HBeAg was performed in the placental tissues, obtained after the delivery, for HBsAg and HBeAg was performed. Serological retesting of the infants was performed at the age of 12 months. Sixteen women (32%) developed HBsAg positivity in the cord blood but HBV-DNA was not detected in any of the 50 cord blood samples tested. All the placental tissues, staining for HBsAg was

negative. Staining for HBsAg was negative for all the placental tissues, whereas 16 (32%) were weakly positive for HBcAg, regardless of the presence or absence of viremia or the maternal viral load. HBV transmission was not observed in any of the 50 neonates. We conclude that HBsAg can be passed through the placental barrier, as it occurs to other proteins, in about one third of HBeAg-negative chronic HBV-infected pregnant women, regardless of the maternal viral load, the mode of delivery or the placenta HBV pathology. The clinical impact of this phenomenon on the intrauterine or transplacental transmission of HBV infection does not seem to be important.

Key words: hepatitis B surface antigen, cord blood, hepatitis B virus, vertical transmission

HBV: Ιός της ηπατίτιδας Β

HBsAg: Πρωτεΐνη του φακέλου της επιφάνειας του ιού της ηπατίτιδας Β ή Αυστραλιανό αντιγόνο

HBeAg: Πρωτεΐνη του πυρηνοκαψιδίου του ιού της ηπατίτιδας Β

HBc: Πρωτεΐνη του πυρήνα του ιού της ηπατίτιδας Β

HBV-DNA: Πυρηνικά οξέα του ιού της ηπατίτιδας Β

Βιβλιογραφία

1. Elefsiniotis IS, Glynou I, Pantazis KD, Fotos N, Magaziotou I, Kada H: Prevalence of chronic HBV infection among 13,581 women at reproductive age in Greece: a prospective single-center study. *J Clin Virol* 2005; 32:179-180.
2. Elefsiniotis IS, Glynou I, Magaziotou I, Pantazis KD, Fotos N, Brokalaki H, Kada H, Saroglou G: HBeAg negative serological status and low viral replication levels characterize chronic hepatitis B virus-infected women at reproductive age in Greece: a one-year, prospective single-center study. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4879-4882.
3. Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A, et al. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1989;2: 588-91.
4. Hadziyannis S, Papatheodoridis G. Hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B: natural history and treatment. *Semin Liver Dis* 2006;26(2):130-41.
5. Soderstrom A, Norkrans G, Lindh M: Hepatitis B virus DNA during pregnancy and post partum: aspects on vertical transmission. *Scand J Infect Dis* 2003; 35: 814-819.
6. Zhang SL, Yue YF, Bai GQ, Shi L, Jiang H. Mechanism of intrauterine infection of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2004;10(February (3)):437-8.
7. Xu DZ, Yan YP, Choi BC et al: Risk factor and mechanism of transplacental transmission of hepatitis B virus: a case-control study. *J Med Virol* 2002;67, (May (1)):20-6.