

Kronik Hepatit B Hastalarında Antinükleer Antikorların Araştırılması

Investigation of Antinuclear Antibodies in Chronic Hepatitis B Patients

Aslı Gamze ŞENER¹, Neriman AYDIN², Cengiz CEYLAN³, Sevin KIRDAR²

¹ İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir.

¹ *Izmir Katip Celebi University, Ataturk Training and Research Hospital, Medical Microbiology Laboratory, Izmir, Turkey.*

² Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın.

² *Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Aydın, Turkey.*

³ Sağlık Bilimleri Üniversitesi İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Hematoloji Bölümü, İzmir.

³ *Health Sciences University, Izmir Tepecik Training and Research Hospital, Division of Hematology, Izmir, Turkey.*

Geliş Tarihi (Received): 27.03.2018 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 28.07.2018

ÖZ

Antinükleer antikorlar (ANA), sistemik otoimmün hastalığı olan hastaların tanısı ve değerlendirilmesine yardımcı olmakla birlikte, pek çok kronik enfeksiyon hastalığında da saptanabilmektedir. Literatürde hepatit C virüsü (HCV) hepatiti ve otoantikor birlikteliği ile ilgili pek çok araştırma olmasına karşın hepatit B virüsü (HBV) hepatiti ile otoantikor birlikteliğini gösteren az sayıda yayın bulunmaktadır. Bu çalışmada, kronik hepatit B hastalarında ANA, antimitokondriyal antikor (AMA), anti-düz kas antikorları (ASMA) ve anti-karaciğer-böbrek mikrozomal antijen (LKM) antikorlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Kronik HBV hasta serumları "European Association for the Study of the Liver (EASL)" (Avrupa Karaciğer Hastalıkları Derneği) kriterlerine göre tanı almış hastalardan elde edilmiştir. Buna göre, önceden tedavi almamış ve kronik HBV hepatiti olduğu histolojik olarak saptanmış 22'si kadın 25'i erkek olmak üzere toplam 47 hasta serumu çalışmada kullanılmıştır. HCV veya insan immünyetmezlik virüsü (HIV) koenfeksiyonu bulunan ya da sistemik otoimmün hastalığı bulunan olgular çalışma dışı bırakılmıştır. Kontrol grubu olarak sağlıklı kan donörlerine ait 30 serum çalışmaya dahil edilmiştir. Otoantikorlar içinde ANA, AMA, ASMA ve LKM antikorları indirekt immünofloresan (IIF) yöntemi ile (Euroimmün, Lubeck, Almanya) çalışılmış ve floresans mikroskopta (Eurostar III plus, Almanya) değerlendirilmiştir. Pozitif sonuçlar zayıf floresansdan güçlüye doğru dört derecede ("+", "++", "+++" ve "++++") sınıflandırılmıştır. Pozitif floresans saptanan serumlar ekstrakte edilebilir nükleer antijen (ENA) pozitifliğini araştırmak için immüno blot (ANA Profile 3, Euroimmün, AG) yöntemi ile ileri değerlendirmeye alınmıştır. Çalışılan serum örneklerinin 8 (%17)'i pozitif sonuç verirken kontrol grubunda tüm örnekler negatif bulunmuştur. Toplam 47 serum içinde AMA, ASMA ve LKM pozitifliği saptanmazken altısı kadın ikisi erkek hasta olmak üzere toplam sekiz hasta serumunda

ANA pozitifliği saptanmıştır. Bir hastada homojen ve nükleoler “++” karışık patern, bir hastada “++” olmak üzere sitoplazmada polar benekli (anti-golgi kompleksi benzeri) boyanma paterni görülmüştür. Diğer altı serumdaki pozitiflik, nükleoler (iki hasta), granüler (iki hasta), ribozomal (bir hasta) ve homojen (bir hasta) patern şeklinde olup tümü “+” olarak değerlendirilmiştir. ENA pozitifliği granüler patern saptanan iki hastadan birinde SS-A ve diğerinde SS-B “kuşuklu +” ve karışık patern saptanan hastada histon “+” şeklinde belirlenirken kalan altı hastada ENA negatif bulunmuştur. Otoantikor pozitifliği, hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Cinsiyet ve yaş ile otoantikor pozitifliği arasında ise istatistiksel ilişki saptanmamıştır. Sonuç olarak, kronik HBV enfeksiyonlu hastalarda otoimmün göstergeler saptanabilir. Bu olgularda yüksek olmayan dilüsyonlarda ANA, AMA, ASMA veya LKM antikor pozitifliğinin otoimmün hastalık kaynaklı olmayabileceği, tedavi almamış olgularda bile kronik viral enfeksiyondan kaynaklanan otoantikorların bulunabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Akut hepatit B enfeksiyonu; antinükleer antikor; immünofloresan yöntem.

ABSTRACT

Antinuclear antibodies (ANA) facilitate the diagnosis and evaluation of patients in many systemic autoimmune conditions. Besides, ANA may also be detected in chronic infectious diseases. Although a number of investigations associated with autoantibody positivity in patients with chronic hepatitis C were reported, autoantibody positivity in patients with chronic hepatitis B remain rarely addressed in the literature. The aim of this study was to evaluate the antinuclear antibody (ANA), antimitocondrial antibody (AMA), anti-smooth muscle antibodies (ASMA) and anti-liver-kidney microsomal antigen (LKM) antibodies in chronic hepatitis B patients. Serum samples were obtained from adult patients with chronic hepatitis B diagnosis according to “European Association for the Study of the Liver (EASL)” criteria. Samples were taken from 47 patients (22 female, 25 male) with treatment-naive, histologically-proven chronic hepatitis B. Cases co-infected with HCV and/or HIV or that also had systemic autoimmune diseases were excluded. As a control group, 30 healthy blood donors were included in the study. Autoantibodies, including ANA, AMA, ASMA and LKM were detected with indirect immunofluorescence (IIF) method (Euroimmune, Lubeck, Germany) and evaluated by fluorescence microscope (Eurostar III plus, Germany). Positive results were graded into 4 levels (“+”, “++”, “+++” and “++++”) from weak to strong. Positive samples were studied with a immunoblotting method (ANA Profile 3, Euroimmun, AG) for the detection of extractable nuclear antigen (ENA). The positive results were detected in 8 (17%) of the HBV patients while all the samples were negative in the control group. The difference between the groups was significant ($p < 0.05$). Among the 47 serum samples tested, none of the patients were positive for AMA, ASMA, LKM. ANA was present in eight of the serum samples in which six were female and two were male patients. Among the IIF patterns of ANA positivity, one mixed pattern (homogeneous and nucleolar) and one cytoplasmic anti-golgi antibody pattern were detected. Positivity grade was “++”. Other positive patterns were nucleolar (two patients), granular (two patients), ribozomal (one patient) and homogeneous (one patient) and positivity grade was “+”. ENA was detected in three samples. Two of them was granular pattern positive samples. SS-A was borderline (\pm) in one and SS-B was borderline (\pm) in one of the samples. In the mixed pattern positive sample, histon was detected as “+”. Autoantibody positivity between the patient and control groups were statistically significant ($p < 0.05$). The difference between autoantibody positivity and gender/age was not statistically significant. In conclusion, autoimmune manifestations may be detected in patients with chronic hepatitis B. Low level titer of antibodies such as ANA, AMA, ASMA or LKM may be present in such patients. An increased frequency of these autoantibodies may be associated with non-autoimmune conditions such as chronic viral infection even in treatment-naive patients.

Keywords: Chronic hepatitis B infection; antinuclear antibody; immunofluorescence assay.

GİRİŞ

Antinükleer antikorlar (ANA) ilk tanımlandığı 1958 yılından beri sistemik otoimmün hastalığı olan hastaların tanısı ve değerlendirilmesinde romatologların yardımcısı olmakla birlikte, pekçok enfeksiyon hastalığında da saptanabilmektedir¹. Otoimmüniteyle ilgili bulgulara veya otoimmün hastalıklar hepatit B virüsü (HBV) ve hepatit C virüsü (HCV) enfeksiyonlarında saptanabilmektedir². Literatürde HCV hepatiti ve otoantikor varlığı ile ilgili pekçok araştırma^{3,4} olmasına karşın HBV hepatiti ile otoantikor birlikteliğini gösteren az sayıda yayın bulunmaktadır⁵. Diğer yandan, sağlıklı yetişkinlerde kullanılan yöntemle bağlı olarak oran değişmekle birlikte, %5 veya daha yüksek otoantikor pozitifliği saptanmaktadır¹. Bu çalışmada, kronik hepatit B hastalarında ANA, antimitokondriyal antikor (AMA), anti-düz kas antikorları (ASMA) ve anti-karaciğer-böbrek mikrozomal antijen (LKM) antikorlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul onayı ile gerçekleştirildi. (Tarih: 18.02.2018 Karar no: 2018/1317).

Bu çalışmada kronik HBV hasta serumları, "European Association for the Study of the Liver (EASL)" (Avrupa Karaciğer Hastalıkları Derneği)⁶ kriterlerine göre tanı almış hastalardan alındı. Buna göre önceden tedavi almamış ve kronik HBV olduğu histolojik olarak da saptanmış 22'si kadın 25'i erkek olmak üzere toplam 47 hasta serumu toplandı. HCV veya insan immünyetmezlik virüsü (HIV) koenfeksiyonu bulunan ya da sistemik otoimmün hastalığı olanlar çalışma dışı bırakıldı. Kontrol grubu olarak sağlıklı kan donörlerine ait 30 serum kullanıldı. Otoantikorlar ANA, AMA, ASMA ve LKM indirekt immünofloresan (IIF) yöntemi ile (Euroimmün, Lubeck, Almanya) çalışıldı ve floresan mikroskopta (Eurostar III plus, Euroimmün, Almanya) değerlendirildi. Serumlar üretici firma önerilerine göre HEp-20-10 karaciğer biyoçip (maymun) kullanılarak 1/100 dilüsyonda çalışıldı. Pozitif kontrolün floresans yoğunluğunun "++++" kabul edildiği çalışmada preparatlar x400 objektifle "+", "++", "+++" ve "++++" olarak değerlendirildi. Bu aşamada "Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği (KLİMUD)" tarafından hazırlanmış olan "Otoantikorların laboratuvar tanısı rehberi" kriterleri kullanıldı⁷. Pozitif floresans saptanan serumlar ekstrakte edilebilir nükleer antijen (ENA) pozitifliğini araştırmak için immüno blot (ANA Profile 3, Euroimmun, AG) yöntemi ile ileri değerlendirmeye alındı. İmmüno blot ile 15 farklı antijene (nRNP, Sm, SS-A, Ro52, SS-B, Scl-70, PM/Scl, Jo-1, CENP B, PCNA, dsDNA, nükleozom, histon, Rib-P, M2) karşı oluşan otoantikorlar araştırıldı. İstatistiksel değerlendirmede ki-kare ve student t-test kullanıldı.

BULGULAR

Hasta grubu yaş ortalaması 52.0 (yaş aralığı: 25-69) kontrol grubu ise 32 (yaş aralığı: 24-47) olarak belirlenmiştir. Çalışılan serum örneklerinin %17'si pozitif sonuç vermiştir. Çalışılan örneklerde AMA, ASMA ve LKM pozitifliği saptanmamıştır. Tıbbi kayıtlara göre, pozitif sonuç saptanan hastalarda otoimmün bozukluk tanısı saptanmamıştır. Toplam

Tablo 1. Otoantikor Pozitifliği Saptanan Hastaların Sonuçları

Hasta serum no	Yaş	Cins	ANA	ASMA	AMA	LKM	ENA
1	45	K	Nükleolar +	-	-	-	
2	38	K	Nükleolar +	-	-	-	
3	50	K	Ribozomal +	-	-	-	
4	64	E	Granüler +	-	-	-	SS-A ± SS-B ±
5	49	E	Nükleolar ++ Homojen ++	-	-	-	Histon +
6	61	K	Granüler +	-	-	-	SS-A ± SS-B ±
7	52	K	Antigolgi ++	-	-	-	
8	62	K	Homojen +	-	-	-	

47 serum içinde AMA, ASMA ve LKM pozitifliği saptanmazken, altı kadın iki erkek hasta olmak üzere toplam sekiz hasta serumunda ANA pozitifliği saptanmıştır. Bir hastada homojen ve nükleolar “++” karışık patern, bir hastada “++” olmak üzere sitoplazmada polar benekli (anti-golgi kompleksi benzeri) boyanma paterni görülmüştür. Diğer altı serumdaki pozitiflik, nükleolar (iki örnek), granüler (iki örnek), ribozomal (bir örnek) ve homojen (bir örnek) patern ve tümü “+” olarak değerlendirilmiştir. ENA pozitifliği granüler patern saptanan hastalarda SS-A ve SS-B “kuşukulu” ve karışık patern saptanan hastada histon “+” şeklinde belirlenmiştir. Kalan altı hastada ENA negatif bulunmuştur. Ki-kare testi ile otoantikor varlığı açısından hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Cinsiyet ve yaş ile otoantikor pozitifliği arasında ise istatistiksel ilişki saptanmamıştır ($p > 0.05$). Sonuçlar Tablo 1’de gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Bu çalışmada önceden tedavi almamış kronik hepatit B hastalarında ANA araştırılmıştır. Acay ve arkadaşları⁸ tarafından yapılan bir çalışmada otoimmün bozukluğu olmayan ve interferon tedavisi almamış olan 79 kronik HBV hastasında ANA pozitifliği %12 olarak bildirilmiştir. Ba ve arkadaşları⁹ 325 kronik HBV hastasını kapsayan retrospektif çalışmada ANA pozitifliğini %23.4 olarak bildirmişlerdir. Çalışmada kronik HBV enfeksiyonunda otoimmün hepatit ve primer biliyer sirozla ilişkili otoantikorların sıklıkla saptandığı, ANA, özellikle de homojen ANA pozitifliğinin daha ılımlı bir klinik tablo ile ilişkili olabileceği vurgulanmıştır. Çalışmamızda biri “+” diğeri “++” floresans şiddetinde olmak üzere iki örnekte homojen ANA paterni saptanmıştır. İmmüno blot test ile incelenen “++” homojen paterne sahip örnekte histon “+” bant görülmüştür. Diğer “+” örnek, immüno blotta negatif olarak tespit edilmiştir. Lu ve arkadaşları¹⁰ 312 kronik HBV hastasının 45 (%14.4)’inde sistemik otoantikor pozitifliği saptamıştır. Çalışma sonuçlarına göre LKM pozitifliği saptanmazken, ANA %12.8, ASMA %1.3 ve AMA %0.3 oranlarında pozitif

olarak bildirilmiştir. En sık granüler patern (%72.5), ikinci sıklıkta homojen patern (%22.5) saptanmıştır. Çalışmamızda incelenen örnek sayısının azlığına bağlı olarak herhangi bir paternin sıklığından söz edilememektedir. Ancak, araştırmamız kronik HBV hastalarında düşük titrelerde otoantikör saptanabileceği sonucunu desteklemektedir¹⁰.

Kronik HBV enfeksiyonu tanısı almış 80 çocuk hastanın irdelendiği bir araştırmada ANA pozitifliğinin ilk değerlendirilmede %15 olduğu, daha sonra izlem süresince bu seviyenin %21.2'ye yükseldiği bildirilmiştir. Söz konusu makalede interferon tedavisinin ANA oranını yükselttiği ancak ANA pozitifliğinin tedaviye yanıtı etkilemediği vurgulanmıştır¹¹. Çalışmamızdaki hasta grubu önceden antiviral tedavi almamış hastalardan oluşmaktaydı. Viral enfeksiyonların tek başına otoimmüniteyi tetikledikleri bilinmektedir¹². Kronik hepatit B enfeksiyonunda organ spesifik olmayan otoantikörlerin pozitif olarak saptanması olağan olmakla birlikte genellikle 1/40-1/160 gibi düşük titrelerde saptanmaktadır¹³. Çalışmamızda başlangıç dilüsyonunun 1/100 olduğu düşünülürse altı örnekte "+" titrede saptadığımız ANA pozitifliği > 1/100- < 1/320 dilüsyonuna karşılık gelmektedir ve düşük pozitiflik olarak kabul edilmektedir. Diğer "++" örnek ise $\geq 1/320$ - < 1/1000 dilüsyonuna karşılık gelmektedir. 1992-2014 yılları arasında 53 kronik hepatit B hastasının otoantikör yönünden interferon tedavisi öncesinde, tedavi süresince ve sonrasında izlendiği bir çalışmada¹⁴ otoantikör pozitifliğinin tedavi sonrası belirgin olarak arttığı ancak bunun otoimmün hastalık gelişmesiyle ilişkili olmadığı vurgulanmıştır.

HBV ile ilişkili otoimmünite göstergelerinin irdelendiği bir derlemede en yaygın biyolojik göstergenin %7 oranı ile ASMA olduğu, bunu ANA (%3), antinükleozom (%2), LKM (%2), kriyoglobulinemi (%2) ve romatoid faktörün (%2) izlediği bildirilmiştir¹⁵. Aktif viral replikasyonu gösteren diğer patojenik mekanizmalar da otoimmüniteye katkıda bulunmaktadır. Bu nedenle, reaktivasyon dönemindeki kronik HBV hastalarının çoğunda otoimmünite belirtilerinin saptandığı da bildirilmiştir¹⁶. Li ve arkadaşlarının¹⁷ yaptığı çalışmada 360 kronik hepatit C, 69 kronik hepatit B, 59 otoimmün hepatitli hasta incelenmiş, LKM-1 antikoru HCV'li hasta grubunda 9 (%3), HBV'li hasta grubunda 0 (%0), otoimmün hepatitli hasta grubunda ise 2 (%3) olguda pozitif bulunmuştur. Koşar ve arkadaşlarının¹⁸ ülkemizde yaptıkları çalışmada; HBV ve HCV'ye bağlı kronik karaciğer hastalığında LKM-1 otoantikörü hiçbir olguda pozitif bulunmamıştır. Acar ve arkadaşları¹⁹ ise 30 kronik HBV enfeksiyonlu hastada 3 (%10) ANA pozitifliği, 10 (%33.3) ASMA pozitifliği, 1 (%3.3) LKM-1 antikör pozitifliği, 16 (%53.3) AMA-M2 pozitifliği, 3 (%10) anti-dsDNA ve anti-ssDNA antikör pozitifliği saptamışlardır.

Sonuç olarak, kronik HBV enfeksiyonlu hastalarda otoimmün göstergeler saptanabilir. Yüksek olmayan dilüsyonlarda ANA, AMA, ASMA veya LKM antikör pozitifliğinin otoimmün hastalık kaynaklı olmayabileceği, tedavi almamış olgularda bile kronik viral enfeksiyondan kaynaklanan otoantikörlerin bulunabileceği konusunda klinisyenin dikkati çekilmelidir. Klinik bulgular, saptanan patern ile titresi ve doğrulama testleri otoimmün hastalıklar ve kronik HBV birlikteliği veya salt viral enfeksiyon kaynaklı otoantikör pozitifliği ayırımında yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Litwin CM, Binder SR. ANA testing in the presence of acute and chronic infections. *J Immunoassay Immunochem* 2016; 37(5): 439-52.
2. Vergani D, Mieli-Vergani G. Autoimmune manifestations in viral hepatitis. *Semin Immunopathol* 2013; 35(1): 73-85.
3. Marconcini ML, Fayad L, Shiozawa MB, et al. Autoantibody profile in individuals with chronic hepatitis C. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013; 46(2): 147-53.
4. Narciso-Schiavon JL, Schiavon L de L. Autoantibodies in chronic hepatitis C: a clinical perspective. *World J Hepatol* 2015; 7(8): 1074-85.
5. Li BA, Liu J, Hou J et al. Autoantibodies in Chinese patients with chronic hepatitis B: prevalence and clinical associations. *World J Gastroenterol* 2015; 21(1): 283-91.
6. European Association for the Study of the Liver. *EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection.* *J Hepatol* 2017; 67(2): 370-98.
7. Şener B. Otoantikörlerin laboratuvar tanısı rehberi. Klinik örnekten sonuç raporuna uygulama rehberi. 2015. 2. baskı, Çağhan Ofset, Ankara.
8. Acay A, Demir K, Asik G, et al. Assessment of the frequency of autoantibodies in chronic viral hepatitis. *Pak J Med Sci* 2015; 31(1): 150-4.
9. Li BA, Liu J, Hou J, et al. Autoantibodies in Chinese patients with chronic hepatitis B: prevalence and clinical associations. *World J Gastroenterol* 2015; 21(1): 283-91.
10. Lu J, Lv Y, Dai E, et al. Profile and clinical relevance of autoantibodies in patients with chronic hepatitis B infection. *Int J Clin Exp Med* 2017; 10(2): 3568-74.
11. Pop TL, Stefănescu A, Samaşca G, Miu N. Clinical significance of the antinuclear antibodies in chronic viral hepatitis B in children. *Clin Lab* 2014; 60(6): 931-9.
12. Sener AC, Afsar I. Infection and autoimmune disease. *Rheumatol Int* 2012; 32(11): 3331-8.
13. Rigopoulou EI, Zachou K, Gatselis N, et al. Autoimmune hepatitis in patients with chronic HBV and HCV infections: patterns of clinical characteristics, disease progression and outcome. *Ann Hepatol* 2014; 13(1): 127-35.
14. Orságová I, Rožnovský L, Petroušová L, et al. Investigation of autoimmunity markers during interferon alpha therapy of chronic hepatitis B and C-twenty years of experience. *Klin Mikrobiol Infekc Lek* 2016; 22(2): 61-7.
15. Cacoub P, Terrier B. Hepatitis B-related autoimmune manifestations. *Rheum Dis Clin of N Am* 2009; 35(1): 125-37.
16. Fortes MP, Iglesias R, Machado IV. Autoimmune manifestations in chronic hepatitis B. *Gastroenterol Hepatol Open Access* 2017; 8(1): 00268.
17. Li B, Zhen-Ru F, Hai-Ying L, et al. Prevalence of antinuclear and anti-liver-kidney-microsome type-1 antibodies in patients with chronic hepatitis C in China. *Chin Med J* 2009; 122(1): 5-9.
18. Koşar Y, Tezel A, Oğuz P, et al. Kronik viral hepatitler ile otoimmün hepatitlerde otoantikörlerin prevalansı. *Türk J Gastroenterol* 1997; 8: 381-4.
19. Acar S, Yakar N, Kaya E, et al. The investigation of autoantibody seroprevalence in HBV DNA and HCV RNA positive chronic hepatitis B and C patients. *Sakarya Med J* 2017; 7(2): 79-84.