

Kronik Hepatit B Virus Enfeksiyonunda Kantitatif Anti-HBcIgM Testi

Tijen Özacar*, Selda Erensoy*, Ayşın Zeytinoğlu*, Cengiz Çavuşoğlu*,
Nadir Yönetci**, Altınay Bilgic*

ÖZET

Bu çalışmada Nisan 1993-Ağustos 1994 tarihleri arasında toplanan ve akut hepatit B'ye ait olmayan 1183 serum örneğinde, "enzyme-linked fluorescent immunoassay" (ELFA) yöntemi ile kantitatif olarak anti-HBcIgM araştırıldı. Diğer HBV serolojik göstergeleri mikro "enzyme immune assay" (EIA); HBV-DNA, sıvı hibridizasyon yöntemi ile araştırıldı. HBsAg ve HBeAg olumlu serum örneklerinin %41.8'inde; HBsAg olumlu HBeAg olumsuz örneklerin ise %19.7'sinde anti-HBcIgM olumlu bulundu (≥ 10 Paul Ehrlich Institute Unit/ml) ($p < 0.00005$). HBsAg olumsuz serum örneklerinden anti-HBc ve anti-HBs olumlu olan 599 örneğin 14'ünde, anti-HBe ve anti-HBc olumlu 75 örneğin 3'ünde ve salt anti-HBc olumluluğu olan 103 örneğin 1'inde anti-HBcIgM olumlu bulundu. HBV-DNA olumlu örneklerdeki olumluluk oranı (%44) olumsuz örneklerden (%15.4) anlamlı olarak yüksekti ($p < 0.0005$).

Serum alanin aminotransferaz (ALT) değerleri ile anti-HBcIgM olumluluğu arasındaki ilişkiyi araştırmak için kronik B hepatitli 28 olgu seçildi. ALT değerleri 50 Ü/L'den yüksek 14 örneğin 4'ünde anti-HBcIgM, HBV-DNA ve HBeAg olumlu iken; ALT düzeyleri ≤ 50 Ü/L olan 14 örnek arasında her üç göstergesi birlikte olumlu olan yoktu. ALT düzeyleri ve HBV-DNA olumluluğu ile anti-HBcIgM olumluluğu arasında anlamlı ilişki bulundu ($p < 0.05$). Bu verilerle duyarlı ve kantitatif anti-HBcIgM testinin kronik B hepatiti izleniminde ve aktivasyon tanısında yardımcı olacağı sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Kantitatif anti-HBcIgM, HBV-DNA, Kronik hepatit B enfeksiyonu

SUMMARY

Anti-HBcIgM Test in Chronic Hepatitis B Infection

It was planned to evaluate quantitative IgM anti-HBc response in chronic hepatitis B virus (HBV) infection. 1183 serum samples collected between april 1993-august 1994 and did not belong to acute hepatitis B were screened for IgM anti-HBc by enzyme-linked fluorescent immunoassay (ELFA). The other serological markers were investigated by micro enzyme immunoassay and HBV-DNA by liquid hybridization technique. In 41.8% of HBsAg and HBeAg positive serum samples and in only 19.7% of HBsAg positive, HBeAg negative serum samples IgM anti-HBc was positive ((10 Paul Ehrlich Institute Unit/ml) ($p < 0.00005$). Among the HBsAg negative serum samples, 14 of 599 anti-HBc and anti-HBs positive, 3 of 75 anti-HBe and anti-HBc positive, and 1 of 103 isolated anti-HBc positive were found to be IgM anti-HBc positive. HBV-DNA positive samples were more frequently positive than HBV-DNA negative samples (44.0% versus 15.4%) ($p < 0.0005$).

Twenty eight serum samples from chronic hepatitis B patients were chosen to investigate the association of IgM anti-HBc seropositivity with serum alanine aminotransferase (ALT) levels. Four of 14 with ALT levels higher than 50 U/L were IgM anti-HBc, HBV-DNA, and HBeAg positive in serum. From 14 patients whose serum ALT levels were less than or equal to 50 U/L, none of them had all of these three markers positive. There was a direct correlation between high ALT levels and HBV-DNA positivity and IgM anti-HBc positivity ($p < 0.05$). Thus, a sensitive and quantitative IgM anti-HBc test is helpful in following chronic B hepatitis and diagnosis of activation.

GİRİŞ

Akut hepatit B enfeksiyonunun serolojik göstergesi anti-HBcIgM olumluluğudur. Ancak kronik hepatit B olgularında, hatta asemptomatik HBV taşıyıcılarında da düşük düzeylerde anti-HBcIgM olumluluğu saptanabilir (1, 3, 5, 8, 10). Bu değişik grupların anti-HBcIgM düzeyleri arasında önemli fark olduğu bildirilmiştir (1, 3). Kronik B hepatitindeki düşük düzeydeki anti-HBcIgM

olumluluğunun saptanabilmesi için testlerin duyarlılığının yükseltilmesi önerilmektedir (1, 3). Bu amaçla daha duyarlı ve kantitatif anti-HBcIgM testleri geliştirilmiştir (1, 3, 5). Anti-HBcIgM olumluluğu aktif viral replikasyonun dolaylı bir göstergesidir ve HBV enfeksiyonuna bağlı karaciğer hastalığını gösterir. Anti-HBcIgM'in daha duyarlı yöntemlerle ve kantitatif olarak araştırılması, kronik HBV enfeksiyonlu hastaların izleminde yol gös-

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Bornova, İzmir

* Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

** Gastroenteroloji Anabilim Dalı

II. Ulusal Viral Hepatit Simpozyumun (3-4 Kasım 1994, Ankara)'da sunulmuştur.

terici olabilir (1, 5, 7-10). Ayrıca HBsAg taşıyıcılarında gerçek B hepatiti aktivasyonlarının, süperenfeksiyonlardan veya toksik hepatitlerden ayırtedilmesinde de yardımcı olabilir (7, 8). Bu çalışmanın amacı anti-HBcIgM titreleri ile serumda HBeAg ve HBV-DNA gibi diğer HBV replikasyon göstergeleri arasındaki ilişkiyi ve kronik HBV enfeksiyonunda anti-HBcIgM testinin değerini araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Serum örnekleri:

1- Anti-HBcIgM taraması: Nisan 1993-Ağustos 1994 tarihleri arasında HBV enfeksiyonunun araştırılması için laboratuvara gönderilen 1183 serum örneği toplandı. Akut B hepatitli hastaların serum örnekleri çalışmaya dahil edilmedi. Tüm HBV serolojik göstergeleri olumsuz olan 279 serum örneği kontrol grubu olarak alındı. HBV göstergeleri 48 saat içinde test edildi ve HBV-DNA testi için ayrılan örnek -20°C'de saklandı.

2- Anti-HBcIgM ve HBV replikasyon göstergeleri ile ALT ilişkisinin araştırılması: Kronik hepatit B'li olguların serum örnekleri arasından ALT >50 Ü/L olan 14 örnek (Grup A) ve ALT ≤50 Ü/L olan 14 örnek (Grup B) rastgele seçildi.

Testler:

HBV serolojik göstergeleri (HBsAg, HBeAg, anti-HBe, anti-HBc, anti-HBs) mikro-EIA yöntemiyle (Organon Teknika, Hollanda) araştırıldı. Kantitatif anti-HBcIgM testi ELFA ile (BioMerieux, Fransa) VIDAS otomatize sisteminde yapıldı. Üretici firmanın önerdiği gibi 10 Paul Ehrlich Institute Unit/L (PEIU/ml)'nin üzerindeki değerler olumlu kabul edildi. Serumda HBV-DNA, I¹²⁵ ile işaretli HBV probu kullanan sıvı faz moleküler hibridizasyon yöntemiyle araştırıldı (Abbott Diagnostics, ABD). 10 pg/ml'nin üzerindeki HBV-DNA sonuçları olumlu kabul edildi (2).

İstatistiksel analizler binominal ve Mann Whitney testleriyle yapıldı.

BULGULAR

1462 serum örneğinin 279'unda HBV serolojik göstergeleri olumsuz, 1183'ünde en az biri olumlu bulundu. Bunlardan HBsAg olumlu 406 örneğin anti-HBcIgM sonuçları Tablo 1'de özetlenmiştir. Bunların %24.6'sında anti-HBcIgM olumlu bulunmuştur. Bu gruptaki HBeAg olumlu örneklerdeki anti-HBcIgM olumluluğu (%41.8) HBeAg olumsuz örneklerden daha (%19.7) yüksektir (p<0.0005). İki grubun anti-HBcIgM ortanca değerleri karşılaştırıldığında ise anlamlı bir fark bulunmadı. Tablo 2, HBsAg olumsuz bulunan 777 örneğin anti-HBcIgM sonuçlarını diğer HBV serolojik göstergeleriyle ilişkilendirerek özetlemektedir. Anti-HBe ve anti-HBs olumlu 599 örneğin 14'ünde (%2.3); sadece anti-HBe ve anti-HBc olumlu 75 örneğin üçünde (%4); ve

HBeAg	Anti-HBcIgM				TOPLAM n
	Olumlu n	%	Olumsuz n	%	
Olumlu	38	41.8	53	58.2	91
Olumsuz	62	19.7	253	80.3	315
TOPLAM	100	24.6	306	75.4	406

salt anti HBe olumlu 103 örneğin birinde (%0.9) anti-HBcIgM olumlu bulundu. Anti-HBcIgM olumlu bulunan salt anti-HBe olumlu örnek ve anti-HBe ve anti-HBc olumlu üç örnekten ikisi kronik aktif hepatitli olgulara aitti. Bu üç olguda karaciğerde insitu hibridizasyon yöntemiyle HBV-DNA varlığı gösterilirken, serumda HBV-DNA, anti-HBe ve anti-HBc olumlu örneklerden birinde olumlu (65 pg/ml); diğer iki örnekte ise olumsuz bulundu. Anti-HBe ve anti-HBc olumluluğu olan anti-HBcIgM olumlu üçüncü hastaya karaciğer biyopsisi yapılmamıştı. Bu olgunun serum HBV-DNA'sı olumsuz olarak bulundu.

HBV Serolojik Profilin	Anti-HBcIgM				TOPLAM n
	Olumlu n	%	Olumsuz n	%	
Anti-HBc (+) Anti-HBs (+)	14	2.3	585	97.7	599
Anti-HBe (+) Anti-HBc (+)	3	4.0	72	96	75
Salt anti HBe (+)	1	0.9	102	99.1	103
TOPLAM	18	2.3	759	97.7	777

Tablo 3, anti-HBcIgM olumluluğunu serum HBV-DNA ile ilişkili olarak özetlemektedir. HBV-DNA olumlu örneklerdeki anti-HBcIgM olumluluğu (%44), HBV-DNA olumsuz örneklerden (%15.4) yüksektir (p<0.0005). Aynı zamanda anti-HBcIgM değerlerinin ortancası HBV-DNA olumlu grupta anlamlı olarak yüksek bulundu (32 PEIU/ml :13.5 PEIU/ml) (Mann Whitney testi; p<0.05).

HBV serolojik göstergeleri olumsuz olan 279 serum örneğinin ikisinde anti-HBcIgM olumlu bulundu (11 ve 15 PEIU/ml). Her iki örnekte de anti-HAV IgM olumlu fakat romatoid faktör olumsuz idi. Bu örnekler mikro-EIA (Organon Teknika) ve makro-EIA (Abbott Diagnostics) ile test edildiğinde anti-HBcIgM olumsuz bulundu.

Tablo 3: Anti-HBcIgM ve HBV-DNA sonuçları arasındaki ilişki

HBV-DNA	Anti-HBcIgM				TOPLAM n
	Olumlu n	%	Olumsuz n	%	
Olumlu	22	44.0	28	56.0	50
Olumsuz	10	15.4	55	84.6	65
TOPLAM	32	27.8	83	72.2	115

Kronik hepatit B tanısı almış olguların serumlarından seçilmiş 28 örnekte anti-HBcIgM, HBeAg ve serum HBV-DNA'sı ile serum ALT düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildi. ALT düzeyleri >50 Ü/L olan 14 örnek (grup A) ile ≤50 Ü/L olan 14 örnek (grup B) karşılaştırıldı. Tablo 4, iki gruptaki farklı anti-HBcIgM, HBeAg HBV-DNA profilleri olan hasta sayılarını göstermektedir. Grup A'da dört hastada bu göstergelerin üçü de olumlu iken, grup B'de her üçü de olumlu olan hasta yoktur. Grup B'de bu üç gösterge olumsuz olan yedi hasta varken, grup A'da üç olgu vardır. Tablo 5'de anti-HBcIgM, HBV-DNA ve HBeAg yönünden her iki grubun dağılımı görülmektedir. Anti-HBcIgM olumluluğu grup A'da %57.14, grup B'de %21.43 oranında bulunmuştur. Anti-HBcIgM olumlu gruptaki ALT ortalaması (157.75 Ü/L), anti-HBcIgM olumsuz gruptakinden (55 Ü/L) anlamlı olarak yüksektir (p<0.05).

Tablo 4. Kronik B hepatitli 28 olguda ALT düzeyleri ve farklı HBV serolojik profilleri arasındaki ilişki

HBV serolojik profili			ALT (Ü/L)	
Anti-HBcIgM	HBV-DNA	HBeAg	>50	≤50
+	+	+	4	0
+	+	-	1	1
+	-	-	2	1
+	-	+	1	1
-	+	+	1	2
-	+	-	1	0
-	-	+	1	2
-	-	-	3	7
TOPLAM			14	14

TARTIŞMA

Hepatit B virusunun "core" bölgesine karşı oluşmuş IgM türü antikorların varlığı akut B hepatitinin serolojik göstergesi olmakla birlikte birçok kronik B enfeksiyonu olgusunda da anti-HBc IgM saptanabilmektedir (1,3-5, 8, 9). Bununla birlikte akut ve kronik enfeksiyonlarda saptanan anti-HBc IgM titreleri arasında farklılık vardır (1, 3, 4). Akut enfeksiyon sırasında oldukça yüksek titreler saptanırken diğer olgularda düşük titrelerde olumluluk görülmektedir (3, 4). Birçok ticari anti-

HBe IgM testi akut enfeksiyonda görülen yüksek titrede anti-HBc IgM'i saptayacak şekilde düzenlenmiştir. Bu testlerle kronik enfeksiyonlarda bazen düşük optik dansitede olumluluk saptanabilmektedir. Bu testlerin duyarlılığını arttırarak daha düşük düzeylerdeki anti-HBc IgM'i saptamak ve antikorun kantitasyonu ile enfeksiyonun dönemini belirlemek mümkün olabilir (1, 3, 4). Enfeksiyonun klinik dönemini gösterebilecek bir "cutoff" düzeyinin belirlenmesi konusunda literatürde henüz bir fikir birliği yoktur (3, 8). Paul Ehrlich Enstitüsü (Langen, Almanya) akut ve kronik hepatit B enfeksiyonlarını ayırmak için 600 PEIU/ml düzeyini belirlemiştir (3, 5). Kantitatif anti-HBc IgM saptanması için geliştirilmiş testlerden otomatize mikropartikül-EIA (MEIA; Imx CORE-M, Abbott Diagnostics) testinde "index" değeri 1.2'nin üzeri akut hepatit B için pozitif kabul edilmekte; ancak kronik olgular için "index'in" 1 PEIU/ml'ye karşılık gelen 0.2 değerine çekilmesi önerilmektedir (5). Bir diğer otomatize kantitatif anti-HBc IgM testi ELFA yöntemini kullanmakta (VIDAS HBcIgM, bioMerieux) ve antikor miktarını PEIU/ml olarak vermektedir. 100 PEIU/ml'nin altındaki değerlerin kronik enfeksiyon lehine, 100-200 PEIU/ml arasındaki değerlerin akut enfeksiyon lehine yorumlanması; 200 PEIU/ml'nin üzerindeki değerlerin ise kesin akut HBV enfeksiyonu olarak değerlendirilmesi üretici firma tarafından önerilmektedir. Her iki test de "IgM yakalama" prensibine göre çalışmaktadır.

Kronik HBV enfeksiyonunun izlenmesinde kantitatif anti-HBc IgM testinin değerlendirilmesi amacıyla planlanan bu çalışma sonucunda, anti-HBc IgM ile HBV replikasyonu arasında direkt ilişki olduğu görülmüştür. Bu sonuç bu konuda daha önce yapılan çalışmalarla uyumludur (1, 8). Anti-HBc IgM olumluluğu, viral replikasyon göstergeleri olan HBeAg ve HBV-DNA olumlu gruplarda belirgin olarak daha fazladır. Bazı araştırmacılar HBeAg ve HBV-DNA ile anti-HBc IgM olumluluğu arasında ilişki saptamadıklarını bildirmişlerdir (9, 10). Çalışmamızda HBeAg ve HBV-DNA olumsuz gruplarda da anti-HBc IgM olumluluğu saptanmış fakat diğer gruba göre olumluluk oranı daha dü-

Tablo 5. Kronik hepatit B hepatitli 28 olguda ALT düzeyleri ve replikasyon göstergeleri (anti-HBcIgM, HBV-DNA ve HBeAg olumluluğu)

ALT	Anti-HBcIgM		HBV-DNA		HBeAg		TOPLAM n
	n	%	n	%	n	%	
50 Ü/L (grup A)	8	57.14	7	50.00	7	50.00	14
50 Ü/L (grup B)	3	21.43	3	21.43	5	35.71	14
TOPLAM	11	39.28	10	35.71	12	42.86	28

şik bulunmuştur. Antikor yapımının viral replikasyon, HBsAg ve HBcAg sunumu sonrasında konağın virusa karşı immün yanıtına bağlı olduğu, viral replikasyon, HBsAg ve HBcAg sunumu sonrasında olduğu gözönüne alınırsa bu da beklenmeyen bir sonuç değildir. Anti-HBc ve anti-HBe yapımı; HBV replikasyonunu durdurmaya çalışan sitotoksik T-lenfositlerce karaciğerde oluşturulan doku hasarının ve hücrel immün yanıtın indirekt göstergeleridir (6, 8, 9). Serumda anti-HBc IgM saptanması süregelen veya halen olan HBV'ye hücrel immün yanıtı ve karaciğer hasarını düşündürmektedir (6). Bununla birlikte olgular değerlendirilirken yanılma ömrü uzun olan antikor yanıtı da hatırlanmalıdır (10).

Bu çalışmada HBsAg olumsuz örneklerde ve hatta anti-HBs olumlu örneklerde de düşük titrelerde anti-HBc IgM saptanmıştır. Anti-HBs olumlu olgular izlendiğinde anti-HBs ve anti-HBc IgM titreleri arasında ters bir ilişkinin olduğu görüldü. Tüm olgularda anti-HBs titreleri yükselirken anti-HBc IgM titrelerinin düştüğü saptandı. Bu bulgu da IgM türü antikorların olumluluğunun anti-HBs yanıtı başladıktan sonra da uzun süre devam edebildiğini göstermektedir.

Çalışmada kontrol grubu olarak aldığımız 279 HBV serolojik göstergesi olumsuz örnek arasından iki örnekte düşük titrelerde anti-HBc IgM olumluluğu saptanmıştır. Bu iki örnek de akut viral hepatiti olan olgulara aitti ve her ikisinde de anti-HAV IgM olumlu olarak saptandı. Olguların izlemi ile akut viral hepatit A tanısı konan iki olguda saptanan anti-HBc IgM olumluluğu yalancı olumluluk olarak değerlendirildi.

Yirmisekiz kronik hepatit B olgusunda aktivasyonun serolojik göstergesi olarak ALT düzeyleri ile birlikte anti-HBc IgM olumluluğuna bakıldığında anormal ALT düzeyi olan grupta anti-HBc IgM olumluluğunun daha sık olduğu görüldü. Anti-HBc IgM olumlu olan hastaların ALT düzeyleri ortalaması belirgin olarak yüksek bulundu. Bu bulgu diğer araştırmacıların bulguları ile uyumludur (5, 7, 10). ALT dalgalanmalarında anti-HBc IgM olumluluğu; hepatit B aktivasyonunun

süper enfeksiyonlar ve toksisite gibi diğer nedenlerden ayırt edilmesinde yararlı olabilir. Bununla birlikte anti-HBc IgM'in olumsuz olmasının da hepatit B aktivasyonunu ekarte ettirmeyeceği de unutulmamalıdır (3).

Sonuç olarak duyarlı ve kantitatif anti-HBcIgM testi kronik hepatit B enfeksiyonunun izlenmesinde ve aktivasyonların tanısında diğer parametreler ile birlikte yardımcı bir test olarak bulunmuştur.

KAYNAKLAR

1. Brunetto MR, Cerentia MI, Olivieri F, Piantino P: Monitoring the natural course and response to therapy of chronic hepatitis B with automated semi-quantitative assay for IgM anti-HBc. *J Hepatol*, 1993, 19:431-436.
2. Erensoy S, Özacar T, Zeytinoglu A, Arda B, Bilgiç A: Serumda hepatit B virus DNA'sının (HBV DNA) hepatit B virus (HBV) serolojik göstergeleriyle karşılaştırılması. *İnfek Derg*, 1995, 9:157-160.
3. Gerlich WH, Uy A, Lambrecht F, Thomssen R: Cut off levels of immunoglobulin M antibody against viral core antigen for differentiation of acute, chronic and past hepatitis B virus infections. *J Clin Microbiol*, 1986, 24: 288-293.
4. Hadziyannis SJ, Hadziyannis AS, Dourakis S, Alexopoulou A, Horsch A, Hess G: Clinical significance of quantitative anti-HBc IgM assay in acute and chronic HBV infection. *Hepato-Gastroenterol*, 1993, 40:588-92.
5. Marinos G, Smith HM, Naoumov NV, Williams R: Quantitative assesment of serum IgM anti-HBc in the natural course and during interferon treatment of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*, 1994, 19: 303-311.
6. Maruyama T, Ino S, Koike K, Yasuda K, Milich DR: Serology of acute exacerbation in chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology*, 1993, 105:1141-51.
7. Mels GC, Bellati G, Leandro G, Brunetto MR et al.: Fluctuations in viremia, aminotransferases and IgM antibody to hepatitis B core antigen in chronic hepatitis B patients with disease exacerbations. *Liver*, 1994, 14:175-181.
8. Sjogren M, Hoofnagle JH: Immunoglobulin M antibody to hepatitis B core antigen in patients with chronic type B hepatitis. *Gastroenterology*, 1985, 89: 252-258.
9. Sjogren MH, Dusheiko GM, Kew M.C. Song E: Hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma: correlation between IgM antibody to hepatitis B core antigen, hepatitis B e Antigen and hepatitis B DNA. *Am J Trop Med Hyg*, 1988, 39: 582-585.
10. Smith HM, Lau JYN, Davies SE, Daniels HM, Alexander GJM, Williams R: Significance of serum IgM anti-HBc in chronic hepatitis B virus infection. *J Med Virology*, 1992, 36: 16-20.