

ΙΑΤΡΙΚΗ.— Έφαρμογή τῆς τεχνικῆς τοῦ ἀνοσοφθορισμοῦ εἰς τὴν ἀνίχνευ-
σιν τῶν ἀντιγόνων καὶ ἀντισωμάτων τοῦ ἰοῦ ἥπατίτιδος Β, ὑπὸ
Γ. Ε. Μερικά καὶ Σ. Ι. Χατζηγιάννη *.

Ἡ τεχνικὴ τοῦ ἀνοσοφθορισμοῦ ἀποτελεῖ, ὡς γνωστόν, μίαν σύγχρονον ἐργαστηριακὴν μέθοδον, ἡ ὁποία ἔτυχε πολλαπλῶν, μέχρι σήμερον διαγνωστικῶν ἐφαρμογῶν [1]. Ἡ μέθοδος αὕτη στηρίζεται εἰς τὴν ἀνοσολογικὴν ἀντίδρασιν ἀντιγόνου - ἀντισώματος καὶ τὴν δυνατὴν ἀνιχνεύσεως τῆς ἀντιδράσεως ταύτης τῇ βοηθείᾳ φθοριζουσῶν οὐσιῶν, μετὰ τῶν ὁποίων συνδέονται προηγουμένως τὰ χρησιμοποιούμενα ἀντισώματα. Ἡ ἐξέτασις δι' ἀνοσοφθορισμοῦ γίνεται διὰ τοῦ φθοριομικροσκοπίου καὶ ἔχει τὸ προσὸν τῆς μεγάλης εὐαισθησίας καὶ εἰδικότητος.

Εἰς τὸ ἐρευνητικὸν ἐργαστήριον τῆς Β' Παθολογικῆς Κλινικῆς τοῦ Πανεπι-στημίου Ἀθηνῶν ἡ μέθοδος τοῦ ἀνοσοφθορισμοῦ ἐχρησιμοποιήθη κατὰ τὸ παρελ-θὸν εὐρέως εἰς τὴν ἀνίχνευσιν διαφόρων αὐτοαντισωμάτων ἐν τῷ ὄρῳ ὡς καὶ εἰς τὴν μελέτην τῶν ἀνοσοσφαιρινῶν εἰς διαφόρους ἰστούς [2, 4]. Ἡ παρούσα ἀνα-κοίνωσις ἀφορᾷ εἰς τὴν ὑφ' ἡμῶν ἐφαρμογὴν τῆς μεθόδου ταύτης, εἰς τὴν ἀνί-χνευσιν τῶν ἀντιγόνων τοῦ ἰοῦ ἥπατίτιδος Β εἰς τὸ ἥπαρ καὶ τῶν κατὰ τούτων ἀντισωμάτων εἰς τὸν ὄρὸν ἐπὶ ἀσθενῶν μετὰ ποικίλων ἥπατικῶν παθήσεων, ὀφειλομένων εἰς τὸν ἰὸν ἥπατίτιδος Β.

Τὰ μελετηθέντα ἀντιγόνα τοῦ ἰοῦ ἥπατίτιδος Β εἶναι τὸ ἀντιγόνον τῆς ἐπι-φανείας του (HBsAg), παλαιότερον γνωστόν ὡς Αὐστραλιανὸν ἀντιγόνον καὶ τὸ ἀντιγόνον τοῦ πυρήνος του (HBcAg). Τὰ κατὰ τούτων ἐξ ἀντισωμάτων εἶναι ἀντιστοίχως τὸ ἀντι-HBs καὶ τὸ ἀντι-HBc [5].

1. ANIXNEYΣΙΣ ΤΟΥ HBsAg EN Τῷ ΗΠΑΤΙ

Αὕτη κατέστη δυνατὴ ἐπὶ τομῶν κρυοστάτου, διὰ βελόνης βιοψιῶν ἥπατος, προερχομένων ἐξ ἀσθενῶν μετὰ χρονίων ἥπατοπαθειῶν ὡς καὶ ἐξ ὑγιῶν φορέων τοῦ HBsAg. Τῇ χρήσει ἰσχυρῶν ἀντιορῶν κατὰ τοῦ HBsAg, προερχομένων ἐκ πολυμεταγγισθέντων ἀσθενῶν καὶ ἐξ ἀνοσοποιηθέντων πειραματοζῶων, ἐπετεύ-χθη, κατόπιν τροποποιήσεως τῶν συνθηκῶν χρόνου καὶ θερμοκρασίας ἐπωάσεως, ἡ κατάδειξις τοῦ HBsAg εἰς τὸ πρωτόπλασμα τῶν ἥπατικῶν κυττάρων [6, 7].

* G. MERIKAS - ST. HADZIYANNIS, *The technique of immunofluorescence in the study of antigens and antibodies of hepatitis B - virus.*

Τὸ εὔρημα τοῦτο ὑπῆρξεν ἀπροσδόκητον δεδομένου ὅτι, ἐκ τῶν μέχρι τῆς ἐποχῆς ἐκείνης μελετῶν, ἐπιστεύετο ὅτι τὸ HBsAg ἐντοπίζεται εἰς τοὺς πυρήνας τῶν ἥπατικῶν κυττάρων. Τὰ ἡμέτερα εὑρήματα ἐπεβεβαιώθησαν ἀπολύτως εἰς πλείστας μεταγενεστέρως μελέτας καὶ ἡ ὑφ' ἡμῶν χρησιμοποιηθεῖσα τεχνικὴ ἀνοσοφθορισμοῦ ἔτυχε γενικωτέρας ἀποδοχῆς.

Ἡ μελέτη δι' ἀνοσοφθορισμοῦ τοῦ HBsAg ἐν τῷ ἥπατι ἀπέδειξεν ἐπίσης σημαντικὰς διαφορὰς εἰς τὴν ποσότητα, τὴν κατανομὴν καὶ τὴν πρωτοπλασματικὴν ἐντόπισιν τοῦ HBsAg, ἡ παθογενετικὴ σημασία τῶν ὁποίων ἀποτελεῖ ἀντικείμενον συνεχιζομένης ἐρεύνης ἀνὰ τὸν κόσμον. Οὕτως διαπιστοῦνται χαρακτηριστικὰ ἀνοσοϊστοχημικὰ εἰκόνες τοῦ HBsAg καὶ συγκεκριμένως :

- α) Εἰκὼν ἀθρόας πεωτοπλασματικῆς ἐντοπίσεως ἐπὶ ὑγιῶν φορέων.
- β) Εἰκὼν μεμονωμένων θετικῶν ἥπατοκυττάρων καὶ κυττάρων Kupffer ἐπὶ χρονίας ἥπατίτιδος καὶ κίρρωσεως.
- γ) Εἰκὼν ἐπιφανειακῆς ἐντοπίσεως τοῦ HBsAg ἐπὶ τῶν ἥπατοκυτταρικῶν μεμβράνων ἐπὶ χρονίας ἥπατίτιδος.

Ἡ περιγραφεῖσα χαρακτηριστικὴ εἰκὼν ἐντόνου πρωτοπλασματικοῦ φθορισμοῦ ὑπὸ ὑγιῶν φορέων HBsAg παρῴτρυνεν ἡμᾶς εἰς περαιτέρω μελέτην τῆς μορφολογίας τῶν ἥπατικῶν τούτων κυττάρων εἰς τὸ κοινὸν μικροσκοπίον φωτὸς καὶ ὠδήγησεν εἰς τὴν ἀνακάλυψιν [8, 9] χαρακτηριστικῆς ὑφῆς κυττάρων μετὰ ὑαλοειδοῦς πρωτοπλάσματος. Τὰ χαρακτηριστικὰ ταῦτα κύτταρα ἀναφέρονται εἰς τὴν βιβλιογραφίαν συμφώνως πρὸς τὴν ἀρχικὴν ἡμῶν περιγραφὴν [9] ὡς «ground-glass hepatocytes» ὑπὸ τινων δὲ ἐρευνητῶν καὶ ὑπὸ τὸ ὄνομα τοῦ ἐνὸς ἐξ ἡμῶν [10].

2. ΑΝΙΧΝΕΥΣΙΣ ΤΟΥ HBcAg ΕΝ Τῷ ΗΠΑΤΙ

Ἡ ἐντόπισις τοῦ ἀντιγόνου τούτου ἐν τῷ ἥπατι δι' ἀνοσοφθορισμοῦ ἐπετεύχθη [11] εὐθὺς μετὰ τὴν ἀνακάλυψίν του ὑπὸ τῆς J. Almeida. Ἐχρησιμοποιήθη τόσον ἡ ἄμεσος ὅσον καὶ ἡ ἔμμεσος μέθοδος ἀνοσοφθορισμοῦ. Διεπιστώθη ὅτι τὸ HBcAg ἐντοπίζεται εἰς τοὺς πυρήνας τῶν ἥπατοκυττάρων καὶ ὅτι τοῦτο εἶναι ἰδιαίτερος ἄφθονον ἐπὶ χρονίων ἥπατιτίδων ὡς καὶ ὑπὸ συνθήκας ἀνοσοκαταστολῆς.

Ἄντιθέτως ἐπὶ ὑγιῶν φορέων τὸ ἐν τῷ ἥπατι HBcAg ὑπῆρξεν ἐλάχιστον ἢ μὴ ἀνιχνεύσιμον [10, 12]. Δεδομένου ὅτι τὸ HBcAg ἀποτελεῖ ἀντιγόνον αὐτοῦ τούτου τοῦ καψιδίου τοῦ HBV, εὐλόγως συνάγεται ὅτι καὶ ἡ ποσότης τῶν παρα-

γομένων ώριμων σωματιδίων ιού ηπατίτιδος Β είναι σημαντικῶς διάφορος ἐπὶ χρονίας ηπατίτιδος ἢ ἐπὶ ὑγιῶν φορέων.

Ἐκ τῶν ἀνωτέρω ἐφαρμογῶν τῆς μεθόδου τοῦ ἀνοσοφθορισμοῦ εἰς τὴν ἀνίχνευσιν τοῦ HBsAg καὶ HBcAg ἐν τῷ ἥπατι, προέκυψαν, κατὰ συνέπειαν, πληροφορίες ἐπὶ τῆς μοριακῆς βιολογίας τοῦ HBV καὶ στοιχεῖα ἐπὶ τοῦ παθογενετικοῦ μηχανισμοῦ τῆς χρονίας ἥπατοκυτταρικῆς βλάβης ἐξ HBV.

3. ΑΝΙΧΝΕΥΣΙΣ ΕΝ Τῷ ΟΡῶ ANTI - HBs ΚΑΙ ANTI - HBc ANΤΙΣΩΜΑΤῶΝ

Αὕτη κατέστη δυνατὴ διὰ τῆς χρησιμοποίησεως ὡς ὑποστρώματος ἥπατικοῦ ἴστοῦ πλουσίου εἰς ἀντιγόνα τοῦ HBV· καὶ δὴ, προκειμένου περὶ τῆς ἀναζητήσεως τοῦ ἀντι - HBs ἴστοῦ πλουσίου εἰς πρωτοπλασματικὴν HBsAg προκειμένου δὲ περὶ τοῦ ἀντι - HBc ἴστοῦ πλουσίου εἰς πυρηνικὸν HBcAg. Τὰ ἀντιγονικά ὑποστρώματα προήρχοντο κυρίως ἐκ νεκροτομικοῦ ὕλικου ἢ ἐκ χειρουργικῶν βιοψιῶν τοῦ ἥπατος [11, 13]. Ἐχρησιμοποιήθη ἡ μέθοδος τοῦ ἐμμέσου ἀνοσοφθορισμοῦ, εἰς δύο τοῦτέστιν στρώματα, ὡς δεύτερον δὲ στρώμα ἐχρησιμοποιήθησαν ἀντι - IgG ἀντισώματα παραχθέντα εἰς ἀνοσοποιηθείσας αἴγας. Τὰ ἀντισώματα ταῦτα συνεδέθησαν μετὰ φθοριζούσης οὐσίας (φθοριζὸν ἰσοθειακυανικὸν νάτριον).

Ἡ τεχνικὴ αὕτη ἐδείχθη λίαν εὐαίσθητος, προκειμένου δὲ περὶ τῆς ἀνίχνευσεως τῶν ἀντι - HBc ἀντισωμάτων αὕτη ὑπῆρξεν 10 καὶ πλέον φορὰς εὐαίσθητοτέρα τῆς μεθόδου συνδέσεως τοῦ συμπληρώματος [14]. Ἡ ἀναζήτησις τῶν ἀντι - HBs δι' ἀνοσοφθορισμοῦ περιορίσθη εἰς τὸ ἐρευνητικὸν μόνον πεδῖον ἐνῶ εἰς τὴν πρᾶξιν ἐπεκράτησαν ἄλλαι ἀπλούστεραι καὶ εὐαίσθητοτέρα μέθοδοι, ὡς ἡ ραδιοανοσομετρικὴ (RIA) καὶ ἡ τῆς παθητικῆς αἰμοσυγκολλήσεως.

Ἀντιθέτως ἡ δι' ἀνοσοφθορισμοῦ ἀναζήτησις τῶν ἀντι - HBc ἀπεδείχθη λίαν χρήσιμος εἰς τὴν κλινικὴν πρᾶξιν. Τὰ ἀντισώματα ταῦτα ἀναπτύσσονται εἰς τὸν ὄρον μετὰ ἀπὸ πολλαπλασιασμὸν τοῦ HBV εἰς τὸ ἥπαρ, ὑψηλοὶ δὲ αὐτῶν τίτλοι ἀποτελοῦν δείκτην ἐν ἐνεργείᾳ λοιμώξεως διὰ τοῦ HBV.

Ἐκ τῆς ἐφαρμογῆς τῆς μεθόδου ταύτης εἰς τὸ ἡμέτερον ἐργαστήριον προέκυψαν ἐπίσης σαφεῖς διαφοραὶ εἰς τοὺς τίτλους τοῦ ἀντι - HBc μεταξὺ χρονίων ἥπατοπαθειῶν καὶ ὑγιῶν φορέων τοῦ HBV καὶ ἐδείχθη οὕτω ὅτι ἐπὶ τῶν πρώτων ὑπόκειται συνεχῆς καὶ ἔντονος πολλαπλασιασμὸς τοῦ ἰοῦ ηπατίτιδος Β ἐν τῷ ἥπατι [14, 15]. Τὰ εὐρήματα ταῦτα ἐπεβεβαιώθησαν διὰ τῆς ἀναζητήσεως τοῦ HBcAg ἐν τῷ ἥπατι δι' ἀνοσοφθορισμοῦ.

Ἐν συμπεράσματι ἡ ὑφ' ἡμῶν ἐφαρμογὴ τῆς μεθόδου τοῦ ἀνοσοφθορισμοῦ εἰς τὴν μελέτην τῶν ἀντιγόνων καὶ ἀντισωμάτων τοῦ ἰοῦ ηπατίτι-

δος Β ἐν τῷ ὀρῶ καὶ τῷ ἥπατι ὑπῆρξεν ἐπιτυχῆς ἀπὸ τεχνικῆς ἀπόψεως, καρποφόρος ἐπὶ ἐρευνητικοῦ ἐπιπέδου καὶ χρήσιμος εἰς τὴν ἐργαστηριακὴν διάγνωσιν τῶν ἐξ ἰοῦ Β ἥπατικῶν παθήσεων.

ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΟΣ Β

Ἀντιγόνα

1. Ἐπιφανείας : HBsAg
2. Πυρῆνος : HBcAg

Ἀντισώματα

1. Anti - HBs
2. Anti - HBc

1. Ἀντιγόνον HBsAg ἐν τῷ ἥπατι
2. Ἀντιγόνον HBcAg ἐν τῷ ἥπατι
3. Ἀντισώματα anti-HBs καὶ anti-HBc ἐν τῷ ὀρῶ.

Ἐν συμπεράσματι αἱ ἐφαρμοσθεῖσαι μέθοδοι ἀνοσοφθορισμοῦ ὑπῆρξαν :

1. Τεχνικῶς ἐπιτυχεῖς
2. Ἐρευνητικῶς καρποφόροι
3. Διαγνωστικῶς χρήσιμοι.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. G. Nairn, Fluorescent protein tracing. Livingstone Edinburgh and London, 1969.
2. Σ. Χατζηγιάννης, Ἀνοσοϊστοχημικὴ καὶ ὀρολογικὴ μελέτη τῶν νόσων τοῦ ἥπατος. Διατριβὴ ἐπὶ Ὑφηγεσίᾳ. Ἀθήναι, 1969.
3. Σ. Χατζηγιάννης καὶ Ἀ. Μουσοῦρος, Ἡ διαγνωστικὴ ἀξία τῶν ἀντιμιτοχονδριακῶν ἀντισωμάτων ἐπὶ πρωτοπαθοῦς χολικῆς κίρρώσεως. Ἱατρικὴ 29, 529, 1976.
4. Σ. Χατζηγιάννης - Χ. Βυσσοῦλης - Ἀ. Μουσοῦρος - Ἀ. Ἀφρουδάκης καὶ Γ. Μερικάς, Ἀνοσοϊστοχημικαὶ παρατηρήσεις ἐπὶ ἥπατίτιδος. Ἱατρ. Ἐπιθ. Ἐν. Δυναμ. 6, 895, 1972.
5. B. S. Blumberg, Australia Antigen and the Biology of Hepatitis B. Surface 197, 17 1977.

6. Σ. Χατζηγιάννης και Χ. Βυσσούλης, 'Ανίχνευσις τοῦ Αύστραλιανοῦ ἀντιγόνου ἐν τῷ ἥπατι δι' ἀνοσοφθορισμοῦ. Νοσοκ. Χρονικά 34, 63, 1972.
7. S. Hadziyannis - Ch. Vissoulis - A. Moussouros and A. Afroudakis, Cytoplasmic localization of Australia antigen in the liver. *Lancet* 1, 976, 1972.
8. S. Hatziyannis - M. Gerber - Ch. Vissoulis and H. Popper, Association of cytoplasmic HBAG with characteristic hepatocytes of HBAG carriers. *Gastroenterology* 64, 174, 1973.
9. —, Cytoplasmic hepatitis-B antigen in ground-glass hepatocytes of carriers. *Arch. Pathol.* 96, 327, 1973.
10. W. A. P. Anderson and J. M. Kissane, *Pathology C. V. Mosby Co., Saint Louis. Vol. 2, p. 1346.*
11. S. Hadziyannis - A. Moussouros - A. Giustozzi and J. Almeida, Immunofluorescence study of the «Core» antigen in the liver. *Digestion* 8, 437, 1973.
12. S. Hatziyannis and M. Gerber, Immunofluorescence and electron microscopic study of the hepatitis B «Core» antigen in the liver. *Gastroenterology* 67, 195, 1974.
13. S. Hadziyannis, Immunofluorescence detection of small amounts of circulating Australia antibodies. *Digestion* 5, 247, 1972.
14. S. Hadziyannis and G. Karvountzis, Serum anti-HBc titres in chronic liver disease. *Digestion* 14, 460, 1976.
15. Σ. Χατζηγιάννης - Γ. Καρβουντζής και Γ. Μερίκας, Τὸ ἀντίσωμα anti-HBc σὲ χρόνιες ἡπατοπάθειες. Διαγνωστικὴ καὶ προγνωστικὴ σημασία. 3ον Ἐτήσιον Πανελληνίων Ἱατρικῶν Συνεδρίων, 5-8 Μαΐου. (Περίληψεις Συνεδρίου).

S U M M A R Y

The results of the application of the immunofluorescence technique for the study of the hepatitis antigens and antibodies (HBsAg, HBcAg. and their antibodies) are here reported.

It is stressed that our experience with the method was technically successful, investigatively fruitful and diagnostically useful on patients with Hepatitis B virus diseases.