

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Εγγενής ανοσία και κλινική έκβαση της λοίμωξης από τον ιό της ηπατίτιδας Β  
στα παιδιά**

ΒΙΡΓΙΝΙΑ Ν. ΧΑΤΖΗΔΑΚΗ

Παιδίατρος

Ηράκλειο 2013

**Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

**Γαλανάκης Εμμανουήλ** Αναπληρωτής Καθηγητής Παιδιατρικής-Παιδιατρικών  
Λοιμώξεων, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης (**επιβλέπων**)

**Κουρούμαλης Ηλίας** Καθηγητής Γαστρεντερολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου  
Κρήτης

**Σουρβίνος Γεώργιος** Αναπληρωτής Καθηγητής Ιολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου  
Κρήτης

**Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

**Γαλανάκης Εμμανουήλ** Αναπληρωτής Καθηγητής Παιδιατρικής-Παιδιατρικών  
Λοιμώξεων, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης (**επιβλέπων**)

**Γιαννακοπούλου Χριστίνα** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Νεογνολογίας, Τμήμα Ιατρικής  
Πανεπιστημίου Κρήτης

**Γκίκας Αχιλλέας** Καθηγητής Παθολογίας-Λοιμωξιολογίας, Τμήμα Ιατρικής  
Πανεπιστημίου Κρήτης

**Δημητρίου Ελένη** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αιματολογίας και Ογκολογίας Παίδων,  
Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης

**Κουρούμαλης Ηλίας** Καθηγητής Γαστρεντερολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου  
Κρήτης

**Σαμώνης Γιώργος** Καθηγητής Ογκολογίας- Λοιμωξιολογίας, Τμήμα Ιατρικής  
Πανεπιστημίου Κρήτης

**Σουρβίνος Γεώργιος** Αναπληρωτής Καθηγητής Ιολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου  
Κρήτης

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μελέτη αποτέλεσε την αιτία της γνωριμίας μου με το Πανεπιστήμιο της Κρήτης το 2006, μετά την αποφοίτηση μου από την Ιατρική σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Τα επόμενα χρόνια αποτέλεσαν πολύτιμη περίοδο επιστημονικής καθοδήγησης και είχα την τύχη να διδαχθώ τη μέθοδο εκπόνησης μίας μελέτης, από τις βασικές αρχές της συλλογής των δεδομένων έως τη συγγραφή και παρουσίαση των αποτελεσμάτων. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Εμμανουήλ Γαλανάκη για όλα αυτά, για τη στωική στήριξη του όλη αυτήν την περίοδο, μα κυρίως για το ενδιαφέρον και την αγάπη που μου ενέπνευσε για την έρευνα.

Ευχαριστώ επίσης την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Ελένη Δημητρίου, που με φιλοξένησε εγκάρδια στο εργαστήριο Μητέρας-Παιδιού και συνέβαλε στη διεκπεραίωση των πειραμάτων μου, καθώς και την μοριακή βιολόγο, κ. Δέσποινα Χουμεριανού, η οποία με δίδαξε στα πρώτα μου βήματα στη μοριακή γενετική. Ομοίως ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γεώργιο Σουρβίνο για την έξυπνη καθοδήγηση του στις εργαστηριακές τεχνικές καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου του που απλόχερα με φιλοξένησαν και τον Καθηγητή κ. Ηλία Κουρούμαλη για τις εμπειριστατωμένες συμβουλές του σε κάθε κρίσιμη στιγμή στην πορεία αυτής της μελέτης. Ομοίως ευχαριστώ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Χριστίνα Γιαννακοπούλου, τον Καθηγητή κ. Αχιλλέα Γκίκα και τον Καθηγητή κ. Γεώργιο Σαμώνη για τη συμμετοχή τους στην Εξεταστική Επιτροπή και τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση της μελέτης αυτής.

Ένα ακόμα ευχαριστώ οφείλω στις επιμελήτριες ΕΣΥ της παιδιατρικής κλινικής του νοσοκομείου Καρδίτσας, οι οποίες μου επέτρεψαν και με στήριξαν ηθικά για τη συλλογή των δειγμάτων καθώς και στον κ Ι. Θ. Καβαλιώτη, διευθυντή της Παιδιατρικής Κλινικής του νοσοκομείου Ειδικών Παθήσεων της Θεσσαλονίκης για τα κλινικά δεδομένα των ασθενών της μελέτης που μου παρείχε. Τέλος ευχαριστώ όλα τα παιδιά της μελέτης και τις οικογένειες τους για τη συνεργασία τους.

Ηράκλειο, Μάιος 2013

Βιργινία Ν. Χατζηδάκη

*Αφιερώνεται στην οικογένεια μου και στον καθηγητή μου.*

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b> .....	4
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b> .....	7
<b>A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	9
<b>1. HBV λοίμωξη</b> .....	10
1.1 Πορεία της λοίμωξης και φάσεις ηπατίτιδας B .....	11
1.2 Διάγνωση της λοίμωξης-Ανοσοενζυμικές μέθοδοι .....	13
1.3 Οδοί μετάδοσης στην παιδική ηλικία .....	14
1.4 Αλληλεπίδραση ιού και ανοσολογικών μηχανισμών στην κάθετη μετάδοση.....	16
<b>2. Ο ρόλος της γενετικής ετερογένειας του ξενιστή και του ιού</b> .....	19
2.1 Είδη γενετικής πολυμορφίας .....	19
2.2 Γενετικές παραλλαγές του ξενιστή και κάθετη μετάδοση .....	19
<b>B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	32
1. Σκοπός .....	33
2. Υλικό και μέθοδοι .....	34
2.1 Ασθενείς .....	34
2.2 Ορισμοί .....	35
2.3 Απομόνωση DNA .....	35
2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση της Πολυμεράσης .....	37
2.5 Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων .....	43
2.6 Πολυμορφία μήκους τμημάτων περιοριστικής κοπής .....	44
2.7 ELISA .....	47
3. Στατιστική επεξεργασία .....	49

4. Αποτελέσματα .....	50
4.1 Φύλο και HBV λοίμωξη .....	50
4.2 MBL και HBV λοίμωξη .....	50
4.3 TNF-α -308 και HBV λοίμωξη .....	56
4.4 VDR και HBV λοίμωξη .....	58
5. Συζήτηση .....	63
6. Συμπεράσματα .....	76
7. Περίληψη .....	83
8. Summary .....	87
<b>Γ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....</b>	<b>91</b>
1. Ενήμερη Συγκατάθεση .....	92
2. Βιβλιογραφικές αναφορές .....	93
3. Διεθνείς Δημοσιεύσεις Διατριβής .....	103



## **A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1. HBV ΛΟΙΜΩΞΗ

Η λοίμωξη από τον ιό της Ηπατίτιδας Β σήμερα αποτελεί παγκόσμιο πρόβλημα, καθώς συνολικά υπολογίζονται 350-400 εκατομμύρια χρόνια πάσχοντες, οι οποίοι αποτελούν το 5% του παγκόσμιου πληθυσμού. 75% των πασχόντων συγκεντρώνονται στην ενδημική Ασία και μόλις το 0.3-1.5% στις Δυτικές χώρες. Η χρόνια HBV λοίμωξη ευθύνεται για την ανάπτυξη ηπατικής κίρρωσης και στη συνέχεια ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HCC) και φαίνεται να υπάρχει ισχυρή γεωγραφική συσχέτιση μεταξύ της εξάπλωσης του HBV και της συχνότητας του HCC ή της θνησιμότητας από αυτό παγκοσμίως [1].

Η γνώση σχετικά με τον HBV είναι προϊόν των τελευταίων 50 ετών, καθώς μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1960 τίποτα δεν ήταν γνωστό για την ιογενή ηπατίτιδα και μόλις το 1967 αποδείχτηκε ότι μία πρωτεΐνη του ορού, το Αυστραλιανό αντιγόνο (Au antigen), το οποίο είχε ανακαλυφθεί νωρίτερα από τους Blumberg et al., σχετιζόταν με την ιογενή ηπατίτιδα Β. Το Αυστραλιανό αντιγόνο αποτελούσε την πρωτεΐνη που κάλυπτε τον ιό και έτσι μετονομάστηκε σε HBsAg (αντιγόνο επιφανείας της ηπατίτιδας Β). Ακολούθησαν πλήθος επιδημιολογικών μελετών για να επιβεβαιωθεί η έκταση του προβλήματος όπως είναι γνωστή σήμερα. Ταυτόχρονα άρχισε να γίνεται αδρός διαχωρισμός των χρονίων θετικών HBV ατόμων ανάλογα με τα κλινικοεργαστηριακά τους ευρήματα και την παρουσία ηπατικής νόσου. Η ανίχνευση του e αντιγόνου (HBeAg), μίας επιπλέον πρωτεΐνης του ιού από τους Magnius και Espmark, το οποίο συνδέθηκε με την ιική αντιγραφή και η συνδυαστική μελέτη του HBeAg, του αντισώματος anti-Hbe με τις ηπατικές βιοχημικές και ιστολογικές εξετάσεις, οδήγησε στο διαχωρισμό των ατόμων με χρόνια λοίμωξη σε πάσχοντες θετικούς για το HBeAg και υγιείς φορείς αρνητικούς για το HBeAg και

θετικούς για anti-Hbe. Έτσι ξεκίνησε ο διαχωρισμός της χρόνιας νόσου σε φάσεις, οι οποίες αποδείχτηκε αργότερα ότι είναι διαδοχικά στάδια παρά ανεξάρτητοι τύποι της.

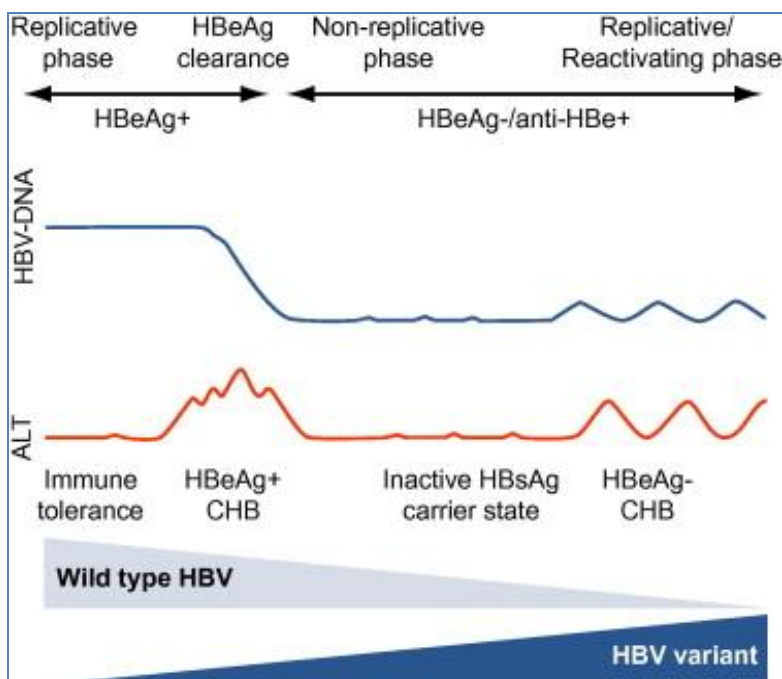
### **1.1 ΠΟΡΕΙΑ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΚΑΙ ΦΑΣΕΙΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Β**

Η κατανόηση της φυσικής πορείας της ηπατίτιδας Β είναι απαραίτητη για την ερμηνεία των ορολογικών αποτελεσμάτων των HBV θετικών ατόμων καθώς και των αλλαγών τους μέσα στο χρόνο.

Η λοίμωξη από τον ιό HBV έχει ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων, από οξεία ασυμπτωματική λοίμωξη έως χρόνια ηπατική νόσο με πιθανότητα εξέλιξης σε ηπατική κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Η οξεία λοίμωξη μπορεί να είναι αυτοπεριοριζόμενη ή μπορεί να εξελιχθεί σε χρόνια λοίμωξη. Η πιθανότητα μετάπτωσης σε χρονιότητα εξαρτάται τόσο από την ηλικία της λοίμωξης, όσο και από τον τρόπο μετάδοσης του ιού, με τα μεγαλύτερα ποσοστά να έχουν περιγραφεί για τα νεογνά που μολύνονται περιγεννητικά από HBeAg θετική μητέρα (80-90%), ενδιάμεσα για τα βρέφη και μικρά παιδιά (20-30%) και εξαιρετικά χαμηλά για ενήλικες (<1%), με εξαίρεση τα ανοσοκατεσταλμένα άτομα.

Όταν η οξεία λοίμωξη γίνει χρόνια (παρουσία HBsAg για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 6 μηνών), η πορεία της λοίμωξης ακολουθεί τέσσερις φάσεις που ποικίλλουν ως προς τη διάρκεια και την έκβαση της υποκείμενης ηπατικής βλάβης (Εικόνα Ι). Σε όλες τις φάσεις υπάρχει μία δυναμική ισορροπία μεταξύ της ιικής αντιγραφής και της έντασης της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή. Στις δύο πρώτες το HBeAg παραμένει θετικό ενώ στις δύο επόμενες το HBeAg αρνητικοποιείται και μετατρέπεται σε anti-HBe. Η μετακίνηση του ατόμου από τη μία φάση της χρόνιας νόσου στην επόμενη δε γίνεται πάντα

αντιληπτή λόγω της μικρής διάρκειας ή εξαιτίας του ενδεχομένου κάποια από τις φάσεις να παραληφθεί.



**Εικόνα I :** Η προτεινόμενη φυσική πορεία της χρόνιας HBV λοίμωξης [2]

Στην πρώτη φάση ή φάση της ανοσολογικής ανοχής είναι έντονη η ιική αντιγραφή, τα επίπεδα ιικού φορτίου είναι πολύ υψηλά, το άτομο είναι μολυσματικό, εντούτοις η ηπατική λειτουργία και ιστολογία είναι ανεπηρέαστη. Αυτή η αρχική φάση είναι χαρακτηριστική για τη λοίμωξη στη νεογνική περίοδο και στην πρόιμη παιδική ηλικία και ποικίλλει σε διάρκεια ανάλογα με τον ακριβή χρόνο της μετάδοσης και την παρουσία HBeAg στον ορό της μητέρας. Η δεύτερη φάση περιλαμβάνει την αντίδραση του ξενιστή έναντι στο ιικό φορτίο. Το τελευταίο παραμένει υψηλό αλλά είναι πλέον εμφανής η επηρεασμένη ηπατική λειτουργία, με υψηλές τιμές τρανσαμινασών, ηπατική νεκροφλεγμονή και ίνωση. Αυτή η

φάση μπορεί να καταλήξει είτε σε HBeAg-antiHbe ορομετατροπή, είτε ακόμα και σε απώλεια του HBsAg, ενδεικτική ίασης. Ενίοτε όμως περιγράφεται εξέλιξη της ηπατικής βλάβης σε κίρρωση, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα έως και θάνατο. Όταν η δεύτερη φάση οδηγήσει σε HBeAg-anti-Hbe ορομετατροπή, το άτομο εισέρχεται στην τρίτη φάση της ανενεργούς φορείας με μικρή υπολειπόμενη ιική αντιγραφή, φυσιολογική ιστολογική ηπατική εικόνα και ηπατοκύτταρα με κυτταροπλασματικές αποθήκες HBsAg. Η HBeAg-anti-Hbe ορομετατροπή δε συνοδεύεται όμως πάντα από οριστική διακοπή της ιικής αντιγραφής και της ηπατικής βλάβης. Η πλειοψηφία των ατόμων μετά την ορομετατροπή μένουν για χρόνια στη φάση της ανενεργούς φορείας με περίπου 2% ετήσια πιθανότητα να απολέσουν το HBsAg και να επιτύχουν την πλήρη ίαση. Κάποιοι άλλοι όμως θα επανεμφανίσουν ιική αντιγραφή και ηπατική βλάβη δηλαδή θα μπουν στο στάδιο της HBeAg- αρνητικής ηπατίτιδας Β. Σήμερα η τελευταία αποτελεί την πιο συχνή μορφή χρόνιας ηπατίτιδας Β στην Ευρώπη, την Αφρική, τη Μέση Ανατολή και τις χώρες της Μεσογείου [2].

## **1.2 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ-ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ**

Η διάγνωση της ηπατίτιδας Β γίνεται με την ανίχνευση των ικών αντιγόνων και των ειδικών αντισωμάτων στον ορό με τη χρήση ενζυμικών τύπου sandwich ανοσολογικών μεθόδων (Enzyme Immunoassays), στις οποίες γίνεται χρήση ανασυνδυασμένων αντιγόνων και αντισωμάτων για τη δέσμευση των κυκλοφορούντων αντισωμάτων και αντιγόνων αντίστοιχα. Η παρουσία των αντιγόνων ή των αντισωμάτων γίνεται αντιληπτή με ένα ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή του υποστρώματος σε έγχρωμο συστατικό. Η οπτική πυκνότητα (optical density) της αντίδρασης είναι ανάλογη της ποσότητας των

αντιγόνων και των αντισωμάτων στο δείγμα. Οι ανοσοενζυμικές αντιδράσεις είναι χαμηλού κόστους, εύχρηστες, πλήρως αυτοματοποιημένες ώστε να διεκπεραιώνουν πολλές αντιδράσεις. Στην κλινική πράξη χρησιμοποιούνται πέντε ορολογικοί δείκτες, συμπεριλαμβανομένων των HBsAg, anti-HBs, HBeAg, antiHBe και antiHBc (total και IgM). Σήμερα εδραιώνεται και η ανίχνευση του ιικού γονιδιώματος και η ποσοτικοποίηση του με real time PCR-αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, μίας ευαίσθητης τεχνικής με χαμηλά ποσοστά ψευδούς θετικού αποτελέσματος [3].

### **1.3 ΟΔΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΣΤΗΝ ΠΑΙΔΙΚΗ ΗΛΙΚΙΑ**

Το DNA του ιού της ηπατίτιδας Β βρίσκεται στο αίμα, στο σπέρμα, στον κόλπο και στο σίελο των χρόνιων πασχόντων με μεγάλη ιαιμία και μεταδίδεται με την επαφή των μολυσματικών υγρών με το δέρμα και τους βλεννογόνους των υγιών ατόμων. Στην πρώιμη παιδική ηλικία οι κύριοι οδοί λοίμωξης είναι η κάθετη μετάδοση στην περιγεννητική περίοδο και η οριζόντια ή ενδοοικογενειακή μετάδοση στην προσχολική ηλικία [4]. Στις ενδημικές περιοχές για τον ιό όπως η ΝΑ Ασία το παιδί μολύνεται περιγεννητικά, ενώ στις περιοχές της Αφρικής και της Μεσογείου νέα δεδομένα συγκλίνουν υπέρ της οριζόντιας μετάδοσης [2]. Στις δυτικές χώρες η ηπατίτιδα Β είναι νόσος της όψιμης παιδικής ηλικίας και της εφηβείας, οπότε η λοίμωξη μεταδίδεται με σεξουαλική συμπεριφορά υψηλού κινδύνου και με τη χρήση ενέσιμων ουσιών.

Ένδειξη της ενδοοικογενειακής μετάδοσης είναι η συγκέντρωση θετικών για τον ιό αδερφιών και η ανεύρεση μεγαλύτερης πιθανότητας το νεότερο παιδί της οικογένειας να φέρει τον ιό αναλογικά με την αύξηση του αριθμού των θετικών αδερφιών του [5]. Οι ακριβείς μηχανισμοί ωστόσο της λοίμωξης στην οριζόντια μετάδοση δεν είναι γνωστοί. Η

ανταλλαγή ειδών προσωπικής υγιεινής, η ανταλλαγή γλυκών ή τσιγλών, το μάσημα των νυχιών σε συνδυασμό με το ξύσιμο του δέρματος των φορέων του ιού έχουν αναγνωρισθεί ως συμπεριφορές κινδύνου για την οριζόντια μετάδοση στην παιδική ηλικία [5].

Η περιγεννητική μετάδοση βρίσκεται στο επίκεντρο έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος, καθώς αποτελεί την οδό μόλυνσης της πλειοψηφίας των παιδιών και ευθύνεται για το 13-26% των χρόνιων φορέων παγκοσμίως [4]. Έχει βρεθεί ότι η συχνότητα μετάδοσης ποικίλλει. Οι μητέρες που φέρουν το HBeAg έχουν 70-90% πιθανότητα να μεταδώσουν τον ιό στο παιδί τους, ενώ εκείνες που φέρουν το anti-HBe έχουν πολύ μικρότερο κίνδυνο μετάδοσης. Ωστόσο αν τα παιδιά αυτά δε λάβουν εμβόλιο κινδυνεύουν να αναπτύξουν κεραυνοβόλο ηπατίτιδα Β από το πιθανά μεταλλαγμένο ιό που έχουν προσβληθεί. Ευρέως αποδεκτή είναι η πρόταση ότι η περιγεννητική μετάδοση είναι πιθανότερη όσο μεγαλύτερος είναι ο τίτλος του HBsAg της μητέρας και το ικό της φορτίο. Η κάθετη μετάδοση του HBV μπορεί να συμβεί στην προγεννητική περίοδο (ενδομήτρια λοίμωξη), στην περιγεννητική περίοδο ή στη μεταγεννητική περίοδο [4].

Η συχνότητα της ενδομήτριας λοίμωξης ποικίλλει από 2% σε μη ενδημικές περιοχές έως και 40% σε ενδημικές περιοχές όπως η Κίνα [6]. Ο σχετικός κίνδυνος μετάδοσης του ιού στο νεογνό φαίνεται να μεταβάλλεται ανάλογα με τη φάση της λοίμωξης, στην οποία βρίσκεται η μητέρα. Στην οξεία φάση, που χαρακτηρίζεται από μεγάλους ρυθμούς ιικού πολλαπλασιασμού και από την ύπαρξη υψηλού ιικού φορτίου, ο κίνδυνος της μετάδοσης του ιού από τη μητέρα στο νεογνό είναι μεγάλος. Το υψηλό ικό φορτίο (HBV DNA) στον ορό της μητέρας είναι ο κύριος προγνωστικός δείκτης της περιγεννητικής μετάδοσης του HBV [6], [7]. Ωστόσο η μόλυνση του νεογνού είναι πιθανή ακόμα και σε πολύ χαμηλά επίπεδα HBV DNA [8]. Επιπρόσθετα, η λοίμωξη στο τρίτο τρίμηνο της κύησης

συνοδεύεται από μεγάλη πιθανότητα μετάδοσης του HBV στο νεογνό αν το τελευταίο δε λάβει ανοσοποίηση (80-90%), σε αντίθεση με τον μικρό κίνδυνο που παρατηρείται στο πρώτο τρίμηνο (10%) [9].

Η περιγεννητική μετάδοση είναι συχνή. Χαρακτηριστικά, όλα τα παιδιά που δε θα λάβουν ανοσοποίηση, θα μολυνθούν αν η μητέρα πάσχει από οξεία νόσο τη στιγμή της γέννησης. Στον τοκετό λαμβάνουν χώρα μικρομεταγίσεις από τη μητέρα στο νεογνό και το παιδί έρχεται σε επαφή με τα μητρικά μολυσματικά υγρά (αίμα, γεννητικές εκκρίσεις) και το αμνιακό υγρό [7]. Γέννηση με καισαρική τομή φαίνεται να μειώνει σημαντικά των κίνδυνο μεταγίσεων από τη μητέρα στο παιδί και την επαφή του με τα μολυσματικά υγρά και έχει προστατευτική δράση στην περιγεννητική λοίμωξη [7].

Στη μεταγεννητική μετάδοση το νεογνό μπορεί θεωρητικά να μολυνθεί μέσω του μητρικού θηλασμού, καθώς ο HBV έχει ανιχνευτεί στο μητρικό γάλα HBsAg θετικών μητέρων. Ωστόσο, σύμφωνα με πρόσφατη μετά-ανάλυση των Zheng και συνεργατών, ο μητρικός θηλασμός δε θεωρείται ότι εκθέτει το νεογνό σε επιπρόσθετο κίνδυνο αν συνδυαστεί με εμβολιασμό ακόμα και για τα παιδιά μητέρων με υψηλή μολυσματικότητα [10].

#### **1.4 Η ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ ΜΕ ΤΟΥΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΥΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΣΤΗΝ ΚΑΘΕΤΗ ΜΕΤΑΔΟΣΗ**

Η έκβαση της λοίμωξης εξαρτάται από μία δυναμική ισορροπία μεταξύ των δράσεων του ιού και του ξενιστή. Η ευπάθεια των νεογνών στην ανάπτυξη χρόνιας λοίμωξης μετά την έκθεση έχει παθοφυσιολογικά αποδοθεί στην ανώριμη ανοσιακή απάντηση: Οι μελέτες της έκφρασης και την λειτουργίας των TLRs σε περιφερικά μονοκύτταρα ενηλίκου αλλά και ομφαλικού αίματος έδειξαν ότι υπάρχουν μεγάλες διαφορές μεταξύ του σήματος που



ξεκινά από τους TLRs μεταξύ των νεογνών και ενηλίκων αναδεικνύοντας την νεογνική ευπάθεια στις λοιμώξεις [11]. Πολλά από τα μόρια που συμμετέχουν στην κλασσική και εναλλακτική οδό του συμπληρώματος ανευρίσκονται στο ομφαλικό αίμα στο 60% ή λιγότερο των συγκεντρώσεων των αντίστοιχων μορίων των ενηλίκων, μερικές φορές αποτελούν μόλις το 10% της τιμής τους. Οι συγκεντρώσεις των ρυθμιστικών πρωτεϊνών είναι επίσης μικρές στο ομφαλικό αίμα [12]. Η ποσοτική και ποιοτική ανεπάρκεια του φαγοκυτταρικού συστήματος θεωρείται μία από τις πιο σημαντικές αιτίες της νεογνικής ευπάθειας στη λοίμωξη. Επιπρόσθετα τα νεογνικά ουδετερόφιλα έχουν μειωμένη τάση να αποπίπτουν οδηγώντας σε παρατεταμένη φλεγμονή μετά τη λοίμωξη, καθώς τα μη αποπτωτικά νεογνικά ουδετερόφιλα διατηρούν την κυτταροτοξική και φλεγμονώδη δράση τους [13]. Η μειωμένη δράση των κυττάρων φυσικών φονέων (natural killer cells), η ανώριμη και μειωμένη απάντηση των T και B λεμφοκυττάρων κατά την εμβρυική ζωή και η αναποτελεσματική σύνθεση των κυτταροκινών είναι σημαντικοί παράγοντες που οδηγούν στην σύνθετη ανεπάρκεια της ανοσολογικής δράσης στη νεογνική ηλικία [12].

Μία εναλλακτική θεωρία που εξηγεί το αδύναμο νεογνικό ανοσιακό σύστημα έναντι του HBV, προτείνει ότι τα ιικά αντιγόνα διέρχονται μέσω του πλακουντιακού φραγμού και προκαλούν κλωνική καταστροφή των ειδικών για τον HBV- T-κυττάρων. Η HBV προπυρηνική πρωτεΐνη (HbeAg) διαπερνώντας τον πλακουντιακό φραγμό με τη μορφή συμπλόκου ανοσοσφαιρίνης G-HbeAg, προορίζεται προς το νεογνικό θύμο και οδηγεί στην εξαφάνιση των HbeAg- HbcAg- T βοηθητικών κυττάρων [14] και προκαλεί την ειδική για τα HBeAg/ HBcAg- αντιγόνα Th κυτταρική ανοχή ενδομήτρια. Αυτό μπορεί να εξηγήσει τα υψηλά ποσοστά χρόνιας λοίμωξης στα παιδιά που γεννήθηκαν από θετικές για τον HBV, φέρουσες το HbeAg μητέρες και την απουσία χρόνιας λοίμωξης σε παιδιά που

γεννήθηκαν από HBeAg αρνητικές μάνες. Αντίθετα τα νεογνά φαίνεται να ανταποκρίνονται στο εμβόλιο έναντι του ιού της ηπατίτιδας Β, κάτι που εξηγείται από την ύπαρξη ανοσιακής ανοχής σε επιλεγμένα ιικά αντιγόνα με εξαίρεση το HBsAg [14], [15], [16], [17].

## **2. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ ΚΑΙ ΤΟΥ ΙΟΥ**

### **2.1 ΕΙΔΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΑΣ**

Η πιο συχνή φυσική ποικιλία στις αλληλουχίες είναι ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός, δηλαδή η σταθερή αντικατάσταση μία βάσης. Άλλες μορφές είναι μικροδορυφορικές αλλαγές, στις οποίες μία μικρή περιορισμένη αλληλουχία επαναλαμβάνεται με τέτοιο τρόπο ώστε ένα άτομο μπορεί να έχει 10 και 12 αντίγραφα του επαναλαμβανόμενου μοτίβου και το άλλο 9 και 11 αντίγραφα [18], ή ποικίλλουσες σε αριθμό μεταξύ των ατόμων αντίγραφα (CNVs), τα οποία αποτελούν διαγραφές και διπλασιασμούς τμημάτων DNA από εκατό μέχρι μερικά εκατομμύρια βάσεις. Οι πρόσφατοι πρόοδοι στον τομέα της μοριακής βιολογίας που αφορούν κυρίως την τεχνολογία της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (polymerase chain reaction PCR) έχουν επιτρέψει την γρήγορη ανίχνευση τέτοιων γενετικών ποικιλιών.

### **2.2 ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ ΚΑΙ ΚΑΘΕΤΗ ΜΕΤΑΔΟΣΗ**

Η λοίμωξη και η κάθαρση από τον HBV πρέπει να αντιμετωπίζεται ως σύνθετο γνώρισμα. Η διαφορετική επιδημιολογία του ιού στους διάφορους εθνικούς πληθυσμούς που ζουν στις ίδιες γεωγραφικές περιοχές μαζί με την ομαδοποίηση του ιού κατά οικογένειες είναι στοιχεία που υποδεικνύουν τη σημασία της συμβολής των γενετικών παραγόντων [19]. Η ταυτόχρονη ανεύρεση φορείας HBsAg σε δίδυμα νεογνά Κινέζων ήταν συχνότερη στα μονοζυγωτικά από τα διζυγωτικά δίδυμα και σε ζεύγη μονήρων νεογνών [20]. Επιπρόσθετα, οι συγγενείς εξ αίματος εμφανίζονται να είναι περισσότερο επιρρεπείς να αναπτύξουν HBV λοίμωξη συγκριτικά με συγγενείς εξ αγχιστείας και η φορεία του HBsAg μειώνεται κατά σειρά από τον πρώτο, στο δεύτερο και στον τρίτο βαθμού συγγενή, αντί να

είναι όμοια όπως θα αναμενόταν για μία κλινική οντότητα με κυρίως περιβαλλοντικό καθορισμό [21]. Μία αναφορά ταυτόχρονης εμφάνισης μονοζυγωτικών διδύμων με HBV λοίμωξη συνοδευόμενη από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα υποδεικνύει επίσης μία παρόμοια γενετική επίδραση στην εξέλιξη της νόσου [22].

Μέχρι τώρα η πιο κοινή τακτική που χρησιμοποιείται στη λοίμωξη από τον HBV είναι η συσχέτιση με υποψήφιους γενετικούς τόπους (πίνακας I). Ανάμεσα στις στρατηγικές που χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση γενετικών δεικτών που εμπλέκονται στο φαινότυπο της ασθένειας είναι η μέθοδος αναζήτησης υποψηφίων γονιδίων και αναζήτησης συσχέτισης σε όλο το γονιδίωμα (genome wide association studies) [23].

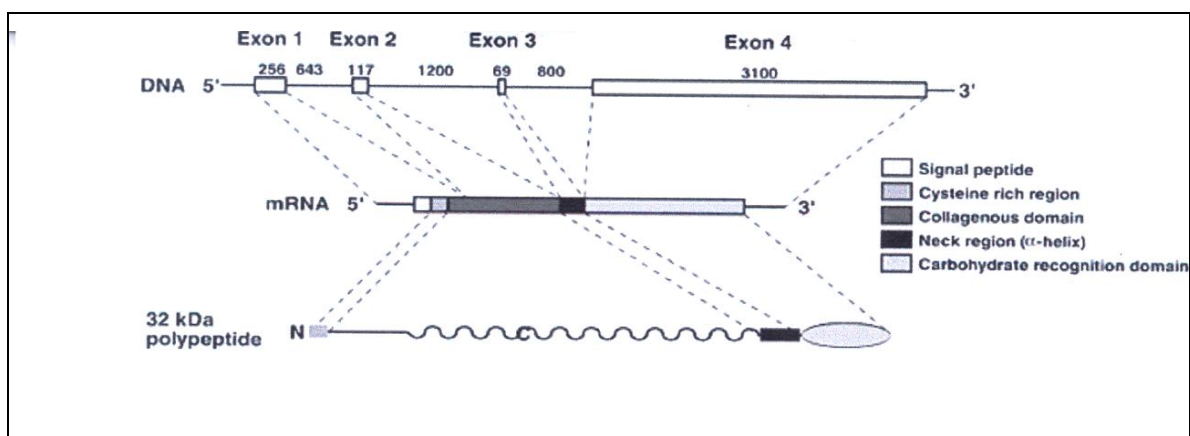
### **Εγγενής ανοσία**

Η ανωριμότητα της επίκτητης ανοσίας προδιαγράφει την ευπάθεια των νεογνών και των βρεφών στη χρόνια HBV λοίμωξη [24] και καθιστά καθοριστικό το ρόλο της εγγενούς ανοσίας για τον πρώιμο έλεγχο του ιού. Τα ανοσολογικά μονοπάτια που την απαρτίζουν και ενδέχεται να είναι αποδυναμωμένα, προδιαθέτοντας σε ευπάθεια είναι εκείνα που εμπλέκονται στα αρχικά στάδια της λοίμωξης, της ανάρρωσης από την οξεία φάση ή στη μετάβαση σε χρόνια λοίμωξη. Από την άλλη πλευρά, οι μηχανισμοί της εγγενούς ανοσίας ενδέχεται να συντελούν στη μακροπρόθεσμη ανοσιακή ανοχή στον HBV, η οποία είναι χαρακτηριστική για τη λοίμωξη στην νεογνική και βρεφική ηλικία.

Για τη διερεύνηση αυτών των ρόλων της εγγενούς ανοσίας, στο επίκεντρο μελετών του παρελθόντος βρέθηκαν οι γενετικές ποικιλίες σε μόρια αναγνώρισης του ιού, όπως η συνδεόμενη στη μαννόζη λεκτίνη (mannose binding lectin MBL). Η MBL είναι ο κύριος παράγοντας του μονοπατιού της λεκτίνης για την ενεργοποίηση του συμπληρώματος, καθώς συνδέεται με την ενδιάμεση επιφανειακή πρωτεΐνη του ιικού φακέλου, ενισχύοντας

τη φαγοκυττάρωση [25] και τροποποιώντας την έκφραση των κυτταροκινών στα μονοκύτταρα [26].

Το γονίδιο της MBL (*mbl2*) (εικόνα I) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 10 (10q 11.2-q21) και αποτελείται από τέσσερα εξόνια που διακόπτονται από τρία ιντρόνια. Ανάμεσα στις διάφορες νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις του γονιδίου, εκείνες σε κωδικοποιούσες περιοχές (κωδικόνιο 52, 54, 57 του εξονίου 1 και κωδικόνιο 3130 του εξονίου 4) και στον υποκινητή (θέσεις -550, -221, +4) έχουν την μεγαλύτερη επίδραση στην έκφραση της MBL.



**Εικόνα II.** Δομή του ανθρώπινου γονιδίου της MBL με τις αντίστοιχες περιοχές του mRNA και της πρωτεΐνης [27]

Οι μελέτες των πολυμορφισμών της MBL στη λοίμωξη από HBV σε ενήλικες αναδεικνύουν ότι οι γονότυποι της MBL που συνδέονται με χαμηλά επίπεδα λειτουργικής πρωτεΐνης και πιθανά ανεπάρκεια της οδού της λεκτίνης του συμπληρώματος, σχετίζονται

με δυσμενή πρόγνωση, δηλαδή ιική επικράτηση και πρόοδο της νόσου, ενώ τα αλληλόμορφα που εκφράζουν υψηλά επίπεδα MBL συνδέονται με ιική αποβολή [28]. Έως τώρα δεν υπάρχουν δεδομένα τα οποία να συνδέουν την ανεπάρκεια MBL με την ευπάθεια στη λοίμωξη από HBV στα πρώτα χρόνια της ζωής, αν και είναι γνωστός ο ρόλος της στην ευπάθεια στις λοιμώξεις της βρεφικής και της παιδικής ηλικίας [29], [30], [31], [32]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει πρόσφατη μελέτη των ποικιλιών της MBL στη μετάδοση του ιού της ηπατίτιδας C (HCV), στην οποία αναφέρεται ίση κατανομή των αλληλομόρφων μεταξύ παιδιών που έχουν μολυνθεί κάθετα και νεογνών που δεν έχουν μολυνθεί παρά την έκθεση τους στον ιό [33].

### **Κυτταρική ανοσία**

Η ενεργοποίηση των αρχικών T κυττάρων προϋποθέτει την αναγνώριση των συμπλόκων ιικών πεπτιδίων- HLA μέσω των TCR υποδοχέων τους. Το μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας (MHC) είναι ο κύριος μεσολαβητής της αντιγονοπαρουσίασης, η πιο πολυμορφική περιοχή του ανθρώπινου γονιδιώματος και φαίνεται να είναι ιδανική υποψήφια περιοχή για μελέτες συσχέτισης με τη νόσο [34]. Αυξανόμενα δεδομένα που απορρέουν από μελέτες διαφορετικών πληθυσμών, υποδεικνύουν ότι τα ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα (human leukocyte antigen (HLA) class I- restricted T cytotoxic cells and HLA class II- restricted T helper cells) έχουν δραστικό ρόλο στην παθογένεση της λοίμωξης από HBV [35]. Υπάρχουν διάφορες συσχετίσεις των αλληλομόρφων HLA με την κάθαρση ή την επικράτηση του HBV στους ενήλικες. Τα ευρήματα είναι συχνά αντικρουόμενα, λόγω της ετερογένειας των πληθυσμών, του πληθυσμιακού bias ή της μεθόδου της μελέτης (υψηλής ή χαμηλής ευκρίνειας), ωστόσο αρκετές συσχετίσεις αναπαράγονται. Τα παιδιά από την Gambia που έχουν μολυνθεί από τον HBV βρέθηκαν να

έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να αποβάλλουν τον ιό αυτόματα όταν φέρουν το αλληλόμορφο DRB1\*13. Η παραπάνω συσχέτιση επιβεβαιώθηκε για το DRB1\*1302 αλληλόμορφο για τον ενήλικο πληθυσμό της μελέτης [36]. Τα πολυμορφικά αλληλόμορφα θεωρούνται γενικά ότι διαφοροποιούν τις ιδιότητες των HLA μορίων και οδηγούν την T κυτταρική απάντηση έναντι συγκεκριμένων HBV αντιγόνων [37]. Ειδικά το HLA-DR13 αλληλόμορφο έχει συνδεθεί με έντονη απάντηση των T βοηθητικών κυττάρων (CD4+ Tcells) έναντι του πυρηνικού αντιγόνου του ιού [38]. Οι μελέτες που αφορούν την κάθετη μετάδοση του HBV έχουν δείξει μεγαλύτερη συχνότητα των HLA-DR\*03 και HLA-DRB1\*07 αλληλομόρφων στις έγκυες γυναίκες, που μεταδίδουν τον ιό στους απογόνους τους και σε νεογνά με ενδομήτρια λοίμωξη αντίστοιχα [39], [40].

### **Κυτταροκίνες και χημειοκίνες**

Ένας από τους αρχικούς μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή είναι η παραγωγή ιντερφερονών (IFNs) τύπου I με αντική και ανοσοτροποποιητική δράση. Οι IFN $\alpha$ / $\beta$  επιλεκτικά καθαρίζουν τα ανώριμα ιικά νουκλεοκαψίδια από το κυτταρόπλασμα των κυττάρων, στα οποία αντιγράφεται ο HBV μεταβάλλοντας το κυτταροπλασματικό προγενωμικό HBV RNA (pgRNA) [41]. Ενώ ήδη είναι γνωστό ότι ο HBV έχει την ιδιότητα να αναστέλλει in vitro την παραγωγή IFN $\beta$  και να εμποδίζει την ενεργοποίηση της IFN $\alpha$  [42], μία πρόσφατη μελέτη έδειξε με σάρωση του γονιδιώματος ότι η ομαδοποίηση των υποδοχέων τύπου II των κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένων των υποδοχέων των ιντερφερονών τύπου I (IFNAR1, IFNAR2) είναι περιοχή με κυρίαρχο ρόλο για την επικράτηση του HBV [43], [44]. Η μελέτη των πολυμορφισμών του υποδοχέα IFNAR1 σε ενήλικες Κινεζικής καταγωγής, οι οποίοι είχαν μολυνθεί με κάθετη μετάδοση, έδειξε ότι η ανάπτυξη χρόνιας λοίμωξης συσχετίζεται με το εξόνιο 3 και τον υποκινητή του υποδοχέα IFNAR1 [45], [46].

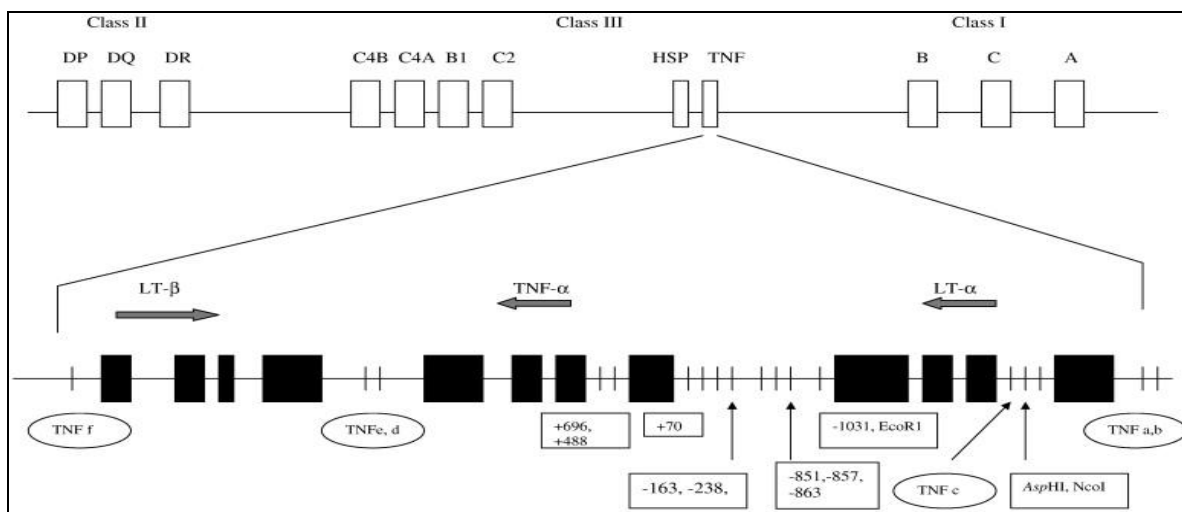
Στην αυτοπεριοριζόμενη λοίμωξη η ιική αντιγραφή συνοδεύεται από μία οξεία φάση με παραγωγή IFN- $\gamma$  και του παράγοντα νέκρωσης του όγκου (tumour necrosis factor alpha-TNF- $\alpha$ ), ακολουθούμενη από ενεργοποίηση της κυτταρικής ανοσίας. Τα CTLs απελευθερώνουν επιπρόσθετη ποσότητα αυτών των προφλεγμονωδών κυτταροκινών και θεραπεύουν νωρίς τα μολυσμένα ηπατοκύτταρα, χωρίς να τα σκοτώνουν [47]. Οι IFN $\gamma$  και ο TNF- $\alpha$  καθαρίζουν αποτελεσματικά τα HBV νουκλεοκαψίδια, τα αντιγραφικά ενδιάμεσα παράγωγα, τα μεταγραφικά πλαίσια του ιού και το επισωματικό κλειστό κυκλικό (ccc) DNA [48].

Οι Pravica και συνεργάτες έδειξαν ότι μία ποικίλου μήκους δινουκλεοτιδική επανάληψη (CA) στο γονίδιο την ανθρώπινης IFN- $\gamma$  διαφοροποιεί την έκφραση της IFN- $\gamma$  in vitro και ότι η μονονουκλεοτιδική αντικατάσταση T σε A (+874A/T) συνδεδεμένη με τη (CA)<sub>12</sub> επαναλαμβανόμενη περιοχή, επηρεάζει την εξαγωγή του προϊόντος της ιντερφερόνης [49], [50]. Οι ενήλικες με το γονότυπο 12-IFN- $\gamma$  CA ήταν πιο πιθανό να αναπτύξουν ανοσία στον HBV, ενώ εκείνοι που έφεραν ένα από τα δύο αντίγραφα του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου +874A ήταν πιο ευπαθείς στη λοίμωξη από τον HBV συγκριτικά με τα άτομα ελέγχου [51]. Στην κάθετη λοίμωξη παρά τη χορήγηση ανοσοπροφύλαξης, τα άνοσα άτομα ήταν πιο πιθανό να είναι φορείς της μικροδορυφορικής επαναλαμβανόμενης περιοχής CA, ενώ τα άτομα που είχαν μολυνθεί με τον ιό ήταν πιο συχνά φορείς του γονότυπου + 874AA της ιντερφερόνης [52].

Ο TNF- $\alpha$  είναι επίσης ένας δραστικός παράγοντας ιικής κάθαρσης, καθώς μπορεί να διασπά τα ιικά σωματίδια, τα μεταγραφικά πλαίσια και το επισωματικό κλειστό με ομοιοπολικούς δεσμούς κυκλικό DNA [53], [54]. Παράγεται από πολυάριθμους τύπους κυττάρων όπως τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα, τα δενδριτικά, τα επιθηλιακά κύτταρα. Το



γονίδιο του TNF εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6p21.3, μέσα στην πολυμορφική περιοχή του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας και βρίσκεται σε «ανισορροπία σύνδεσης» με τα HLA γονίδια (Εικόνα III).



**Εικόνα III.** Σκιαγράφιση του *TNF* μέσα στην περιοχή του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας [55]

Οι πολυμορφισμοί *G/A* στις θέσεις -308 και -238 του υποκινητή του γονιδίου του *TNF-α* έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν την έκφραση του παράγοντα. Η φορεία των αλληλομόρφων *TNF-α -308G* και *-238G* συσχετίστηκε με μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης χρόνιας λοίμωξης ή δυσμενή πρόγνωση της χρόνιας λοίμωξης στους ενήλικες [56], [57], [58]. Σε βρέφη *HBV* θετικών μητέρων, η μελέτη συνήθων πολυμορφικών γονιδίων συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων *TNF-α*, *IFN-γ*, *IL-4* και *IL-10* αποκάλυψε ότι το αλληλόμορφο *TNF-α -238A* μπορεί να επιφέρει ευπάθεια στην ενδομήτρια λοίμωξη, ενώ το αλληλόμορφο *IL-10 -1082G* μπορεί να έχει προστατευτικό ρόλο, υποδεικνύοντας ότι

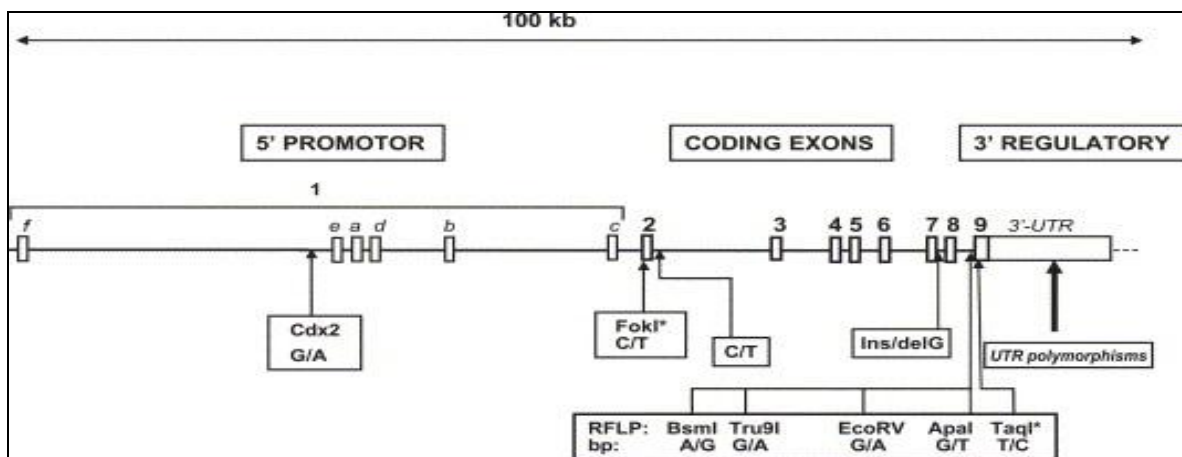
μπορεί να γίνεται μία διαφορετική ρύθμιση του γονιδίου του TNF-α στα βρέφη και στους ενήλικες [59], [60].

Οι χημειοκίνες δρουν ως χημειοπροσελκυστικά μόρια για τα T κύτταρα που επιστρατεύονται στο ήπαρ. Η RANTES είναι μόριο με υψηλή συγγένεια για τον υποδοχέα της χημειοκίνης CC (CCR5). Η μελέτη των ποικιλιών του υποκινητή *RANTES-CCR5* σε ενήλικες Κορεάτικης καταγωγής με HBV λοίμωξη έδειξε ότι το αλληλόμορφο CCR5 - 59029G αυξάνει την πιθανότητα αποβολής του HBV [61]. Η συσχέτιση θα μπορούσε επίσης να είναι σημαντική στη μετάδοση από τη μητέρα στο παιδί, καθώς το μεγαλύτερο μέρος του Κορεάτικου πληθυσμού έχει μολυνθεί στην πρώιμη παιδική ηλικία [45]. Ο CCR5 φαίνεται να είναι επίσης σημαντικός σε άλλες περιγεννητικές λοιμώξεις, όπως η λοίμωξη από τον ιό της ανοσοανεπάρκειας (HIV), στην οποία οι μεταλλάξεις του γονιδίου CCR5 καταργώντας τη μοριακή έκφραση του CCR5, ενός συνυποδοχέα των μακροφαγοτροπικών στελεχών R5-HIV του ιού, προσφέρει προστασία έναντι του HIV [62].

### **Ρυθμιστικοί παράγοντες της ανοσιακής απόκρισης**

Η ενεργός μορφή της βιταμίνης D (1,25 dihydroxyvitamin D3) ενεργοποιεί τα μονοκύτταρα και τα Th2 κύτταρα, αναστέλλει τα Th1 κύτταρα και ρυθμίζει τις ιντερφερόνες, κυτταροκίνες και χημειοκίνες. Με την καταστολή της αντιγονικής έκφρασης και ενεργοποίησης των δραστικών T κυττάρων, η βιταμίνη D επηρεάζει την ιική παρουσίαση. Οι δράσεις της αυτές διαμεσολαβούνται από τον υποδοχέα της VDR [63], [64]. Χαμηλά επίπεδα ικών αντιγόνων, τα οποία εκφράζονται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, είναι ανεπαρκή να ενεργοποιήσουν τα κυτταροτοξικά T κύτταρα, τα οποία προκαλούν ηπατική βλάβη χωρίς να επιφέρουν ιική κάθαρση [24]. Το

γονίδιο του VDR βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12q13.1 και φαίνεται να περιέχει πάνω από 200 πολυμορφισμούς, τέσσερις από τους οποίους είναι οι πιο συχνοί: *FokI*, *BsmI*, *ApaI* και *TaqI* (εικόνα IV).



**Εικόνα IV.** Δομή εξονίων και ιντρονίων στο γονίδιο του υποδοχέα της βιταμίνης D και θέση των γνωστών πολυμορφισμών του [64]

Οι πολυμορφισμοί του υποδοχέα της βιταμίνης D, *TaqI* και *FokI* φαίνεται να επηρεάζουν την έκβαση της λοίμωξης και την οικογενή συνάθροιση. Ο απλότυπος *T-C* (*TaqI-FokI*) ήταν πιο συχνός σε οικογένειες με χρόνια λοίμωξη σε σύγκριση με υγιείς οικογένειες ελέγχου σε μία μελέτη από την Κίνα. Η συσχέτιση αυτή φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από συνεπιδρώντες παράγοντες σύγχυσης όπως το φύλο [65], [66]. Δύο ακόμα μελέτες σε ενήλικες συσχετίζουν τις ποικιλίες του γονιδίου του VDR, *ApaI* *A/a* στο ιντρόνιο 8 και *TaqI* *T/t* στο εξόνιο 9 με την έκβαση της ηπατίτιδας B [67], [68].

Τα άρρενα άτομα έχουν περίπου διπλάσια πιθανότητα να αναπτύξουν χρόνια λοίμωξη από τα θήλεα: η μαρτυρία για τη συσχέτιση του φύλου με την έκβαση της λοίμωξης από τον

HBV παρέχεται από μελέτες σε ζώα [69]. Η αναγνώριση του γονότυπου 29T/T του υποδοχέα 1 των οιστρογόνων (ESR1) σε ένα ευρύ δείγμα Κινέζων ενηλίκων οδήγησε στην υπόθεση ότι το έλλειμμα στην ανοσία έναντι του HBV μπορεί να οφείλεται στην απαντητικότητα του ανοσιακού συστήματος στις ορμόνες του φύλου. Σε μία προσπάθεια να μελετηθεί η ανισορροπία μετάδοσης, το γονίδιο *ESR1* αναλύθηκε σε πυρηνικές οικογένειες. Η συσχέτιση αναπαράχθηκε όταν όλες οι οικογένειες συμπεριλήφθησαν, ωστόσο μετά το διαχωρισμό των οικογενειών σε αυτές με HBsAg θετικές και αρνητικές μητέρες, τα αποτελέσματα ήταν και στις δύο ομάδες μη στατιστικά σημαντικά. Αυτό το αρνητικό εύρημα σε οικογένειες με κάθετη μετάδοση θα μπορούσε να αποδοθεί στο μειωμένο δείγμα αυτών των οικογενειών μετά τη διαστρωμάτωση ή θα μπορούσε ενδεχομένως να υποδεικνύει μειωμένη χρησιμότητα του 29T αλληλομόρφου ως δείκτη ευπάθειας στη μετάδοση από τη μάνα στο παιδί [70].

### **Γονίδια που εμπλέκονται στην προστασία της ανοσοποίησης**

Ο εμβολιασμός είναι μία απλοποιημένη μορφή ανοσιακής απόκρισης στη λοίμωξη και η μελέτη του θα μπορούσε να συμβάλει στην κατανόηση της ανοσοπαθογένειας της HBV λοίμωξης. Οι Hohler και συνεργάτες μελέτησαν προοπτικά 202 μονοζυγωτικά και διζυγωτικά ζεύγη δίδυμων, που είχαν εμβολιαστεί με το ανασυνδυασμένο HBsAg εμβόλιο και πρότειναν ότι το 60% της φαινοτυπικής διαμόρφωσης μπορεί να αποδοθεί στην κληρονομικότητα και το 40% σε περιβαλλοντική επίδραση [71]. Οι συνδυασμοί των υποψήφιων γονιδίων αποδείχτηκε ότι οδηγούν σε έλλειψη απάντησης, καθυστερημένη ή έντονη απάντηση στην ανοσοποίηση [72]. Στα βρέφη το εύρος των εμπλεκόμενων γενετικών παραγόντων είναι μεγαλύτερο συγκριτικά με τα άτομα μεγαλύτερης ηλικίας που είναι ανοσολογικά ωριμότερα. Η χυμική και η κυτταρική απάντηση επηρεάζονται από

δείκτες μέσα και έξω από την περιοχή HLA. Μελέτες που προσδίδουν συγκλίνοντα αποτελέσματα για τους δείκτες του HLA, συσχετίζουν τους φαινοτύπους που ανταποκρίνονται στον εμβολιασμό με τους δείκτες DRB1\*01, DRB1\*0301, DRB1\*11, και DRB1\*15 [73], [74]. Η καθοριστική σχέση της απάντησης στον εμβολιασμό και των HLA τύπου II δεικτών έχει αποδοθεί στο συστατικό DRβ του μορίου HLA-DR, το οποίο φαίνεται να συνδέει ένα μείζον ανοσοκαθοριστικό πεπτιδίο του HBsAg [74]. Το στοιχείο του συμπληρώματος C4AQ0, που εντοπίζεται στην περιοχή του HLA τύπου III, έχει προταθεί ως κείμερο στοιχείο της ανεπαρκούς απάντησης στο εμβόλιο έναντι του HBV, υπογραμμίζοντας τη σημασία του συμπληρώματος για το χυμικό σκέλος της ανοσιακής απόκρισης [73]. Σχετικά με τα μη- HLA γονίδια, η MAPK8, μία κινάση της TLR οδού, η IFN-γ και οι παραλλαγές του υποδοχέα της IL-10 (IL-10RA), έχουν ρόλο στην επαγόμενη από τον εμβολιασμό ανοσία γιατί επηρεάζουν τα επίπεδα του anti-HBs [75]. Επιπρόσθετα, μελέτες πάνω στον εμβολιασμό σε εφήβους έχουν συσχετίσει σε σημαντικό βαθμό την αποτελεσματική απάντηση με τις γενετικές ποικιλίες των Th2 (IL4) και Th1 (IL12B) κυτταροκινών αντίστοιχα (84).

### **Χρησιμότητα των γενετικών δεικτών στην κλινική πράξη**

Οι μελέτες που συνδέουν τα γονίδια του ξενιστή με την ανοσιακή απάντηση παρέχουν τη δυνατότητα καλλίτερης κατανόησης της παθογένειας του HBV στα αρχικά στάδια της ζωής. Οι γενετικοί δείκτες μπορεί να διευκολύνουν την εκτίμηση της μακροπρόθεσμης πρόγνωσης και την αναγνώριση των ατόμων που ενέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν χρόνια λοίμωξη με επιπλοκές. Οι γενετικές μελέτες συνεισφέρουν στην ανάπτυξη στρατηγικών πρόληψης της πρωτοπαθούς λοίμωξης. Ο πρόσφατα αναπτυγμένος τομέας 'vaccinomics' υπόσχεται την ανάπτυξη ατομικών εμβολίων βασιζόμενα στην

ατομική απάντηση στον εμβολιασμό. Ιδιαίτερα για τον ιό της ηπατίτιδας Β, ένα καινοτόμο εμβόλιο, αποτελούμενο από πεπτιδικό ‘coctail’ επιτόπων και βοηθητικών κυτταροκινών όπως ο GCSF, ίσως υπερνικήσει τη μη απαντητικότητα στο εμβόλιο [76]. Με δεδομένο ότι τα διαθέσιμα θεραπευτικά μέτρα έναντι του HBV είναι περιορισμένα, η κατανόηση της γενετικής ευπάθειας μπορεί να οδηγήσει σε νέες συμπληρωματικές θεραπείες και να βοηθήσει την πρόοδο προς το στόχο της ίασης και όχι μόνο της θεραπείας της ηπατίτιδας Β.

#### **Πίνακας I.** Συσχέτιση μη HLA αλληλομόρφων με την ευπάθεια στην HBV λοίμωξη

<p><b>Εγγενής ανοσία</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Mannose binding lectin: Οι SNPs στο γονίδιο <i>mb12</i> (περιοχές του υποκινητή και κωδικοποιούσες) συσχετίστηκαν με ευπάθεια στην ηπατίτιδα Β και τη σοβαρότητα της ηπατικής βλάβης σε ενήλικες [28].</li></ul>
<p><b>Ιντερφερόνες</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Ο <i>IFNARI 19158 C/G</i> SNP σε «ανισοροπία σύνδεσης» με τους -668 / -77 πολυμορφισμούς επηρεάζει την κλινική έκβαση της λοίμωξης από HBV σε ενήλικες [46].</li><li>▪ Το επαναληπτικό αλληλόμορφο <i>12IFN-γ CA</i> και το +874T είναι πιο συχνά στην ομάδα της αποδράμουςας λοίμωξης και σε ενήλικες χρόνιους φορείς αντίστοιχα [51], [65].</li><li>▪ Ο γονότυπος <i>IFN-γ+874AA</i> συνδέθηκε με ενδομήτρια λοίμωξη, το επαναλαμβανόμενο αλληλόμορφο <i>IFN-γ CA</i> είναι λιγότερο συχνό σε άτομα που έχουν μολυνθεί με κάθετη μετάδοση [52], [77].</li></ul>

### **Κυτταροκίνες και χημειοκίνες**

- Το αλληλόμορφο TNF-α -238G της περιοχής του υποκινητή συσχετίστηκε με ιική παραμονή [56]; Το αλληλόμορφο -308 G ήταν πιο συχνό σε ενήλικες που έχουν μολυνθεί και σε χρόνιους φορείς του ιού [57], [58]; Το αλληλόμορφο -238A συνδέθηκε με ενδομήτρια λοίμωξη σε βρέφη που γεννήθηκαν από HBV θετικές μητέρες [59].
- Το αλληλόμορφο IL-10 -1082G βρέθηκε προστατευτικό σε βρέφη που γεννήθηκαν από HBV θετικές μητέρες [60].
- Το αλληλόμορφο του υποκινητή στο γονίδιο του υποδοχέα της RANTES 59029G συνδέθηκε με ιική αποβολή σε ενήλικες [61].
- Οι IFN-γ, MAPK8 και IL10RA συνδέθηκαν με αύξηση του τίτλου των anti-HBs σε εμβολιασμένα βρέφη; Το CD163 συνδέθηκε με anti-HBc ορομετατροπή [75].

### **Ανοσοτροποποιητικοί παράγοντες**

- Υποδοχέας της βιταμίνης D: Οι γονότυποι *TaqI T* και *FokI F*, και ο απλότυπος *T-C* ήταν επικρατέστερος σε χρόνιους πάσχοντες και περιπτώσεις οικογενειών σε σύγκριση με υγιή πληθυσμός ελέγχου [65], [66].
- Οιστρογόνα: Ο 29T/T πολυμορφισμός των ESR1 συνδέθηκε με τη μετάβαση στη χρόνια φορεία στην ενήλικη ζωή [70].

A, adenine; C, cytosine; CCND2, cyclin D type 2; ESR, estrogen receptor; G, guanine; HB, hepatitis B; HBV hepatitis B virus; HbcAg, HBV core antigen; anti-HBs, hepatitis surface antibodies; IFN-γ, interferon gamma; IFNAR, interferon alpha receptor; IL, interleukin; MAPK8 mitogen- activated protein kinase 8; T, thymine; SNP; single nucleotide polymorphism, TNF-α, tumor necrosis factor alpha

## **B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΥΠΑΘΕΙΑ ΣΤΗ ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΤΟΥ HBV ΑΠΟ ΤΗ ΜΗΤΕΡΑ ΣΤΟ ΠΑΙΔΙ

### 1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της μελέτης ήταν η ανίχνευση συσχέτισης μεταξύ της γενετικής ετερογένειας και της έκβασης της HBV λοίμωξης στα παιδιά από τη σύγκριση των συχνοτήτων των ποικιλιών του γονιδίου *mbl2*, (μονοσημειακές μεταλλάξεις στο εξόνιο 1 -κωδικόνιο 54 και 57 και στη θέση -221 του υποκινητή), του πολυμορφισμού στη θέση -308 του γονιδίου του TNF-α και των ποικιλιών του γονιδίου του VDR (*ApaI* A/a στο ιντρόνιο 8 και *TaqI* T/t στο εξόνιο 9) σε παιδιά που είχαν γεννηθεί από HBV θετικές μητέρες.

Επιλέχθηκαν οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις ώστε να μελετηθεί το σκέλος της εγγενούς ανοσίας, των κυτταροκινών ή ρυθμιστικών παραγόντων του ανοσοποιητικού συστήματος σε σχέση με την ευπάθεια των παιδιών, με δεδομένο ότι το σκέλος της κυτταρικής ανοσίας υπολείπεται στους πρώτους μήνες της ζωής, τη χρονική δηλαδή περίοδο στην οποία εδραιώνεται η χρόνια HBV λοίμωξη. Οι παράγοντες που επιλέχθηκαν ανήκαν σε διαφορετικά ανοσολογικά μονοπάτια με μικρή πιθανότητα αλληλεπίδρασης μεταξύ τους, ώστε όποια ενδεχόμενη συσχέτιση προέκυπτε να ήταν ανεξάρτητη από τις υπόλοιπες.

Οι πολυμορφισμοί είχαν μελετηθεί στο παρελθόν σε άλλες παθήσεις, σε ενήλικους και παιδιατρικούς πληθυσμούς στο Πανεπιστήμιο της Κρήτης και τα αλληλόμορφα είχαν ανιχνευτεί σε συγκρίσιμες συχνότητες [78], [79], [80].

## **2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ**

Η μελέτη ήταν αναδρομική και συμπεριέλαβε 102 παιδιά και εφήβους (53 αγόρια και 9 κορίτσια) ηλικίας 0.5 με 18.5 (μέση ηλικία 9.17) έτη, τα οποία είχαν γεννηθεί από HBV θετικές μητέρες και άνηκαν σε νομαδικές οικογένειες με φτωχή γενικά συμμόρφωση στο εθνικό σύστημα εμβολιασμού, το οποίο συνιστά ειδική για τον HBV ανοσοσφαιρίνη και πλήρη εμβολιασμό για τον HBV για όλα τα παιδιά HBV θετικών γυναικών. Η συλλογή των ατόμων έγινε από το 2006 έως το 2008 και τα παιδιά είχαν γεννηθεί από το 1989 έως το 2006. Η συχνή αλλαγή κατοικίας των νομαδικών οικογενειών συχνά αποτέλεσε φραγμό για αποτελεσματική παρακολούθηση στην κύηση και την έγκαιρη ανοσοποίηση των παιδιών της μελέτης, πολλά εκ των οποίων είχαν γεννηθεί πριν την εφαρμογή εθνικού συστήματος εμβολιασμού [81].

Τα παιδιά ελέγχθηκαν ορολογικά για τον HBV και όσα βρέθηκαν θετικά για το HBsAg ελέγχθηκαν αργότερα για ενδεχόμενη HBsAg ορομετατροπή. Κανένα παιδί δεν είχε άλλη συνοδό νόσο που θα μπορούσε να επηρεάσει την ηπατική ή την ανοσολογική του λειτουργία και κανένα από τα HBsAg παιδιά δεν είχαν λάβει αντιική θεραπεία. Η μελέτη εγκρίθηκε από την επιτροπή δεοντολογίας της ιατρικής σχολής του πανεπιστημίου της Κρήτης και πραγματοποιήθηκε ύστερα από ενήμερη συγκατάθεση των γονέων και των μεγαλύτερων ηλικιακά παιδιών.

## 2.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Η χρόνια λοίμωξη αναγνωρίστηκε με την παρουσία του HBsAg για διάστημα μεγαλύτερο των 6 μηνών στον ορό και η κάθαρση της λοίμωξης από την εξαφάνιση του HBsAg και την ανάπτυξη anti-Hbs αντισωμάτων. Τα άτομα με μεμονωμένη φορεία anti-HBc δεν συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη, καθώς τα ορολογικά τους αποτελέσματα θα μπορούσαν να υποδεικνύουν χρόνια HBV λοίμωξη αλλά και παλιά λοίμωξη με ψευδώς θετικά anti-HBs [82]. Οι μητέρες ορίστηκαν θετικές για τον ιό με βάση τα ορολογικά τους αποτελέσματα και όχι το ιικό τους φορτίο. Με βάση τα προαναφερόμενα κριτήρια, η ομάδα των χρόνιων παιδιών αποτελούνταν από 33 HBsAg θετικά παιδιά, 14 άρρενα και 19 θήλεα, ηλικίας 3.0 με 18.5 ετών (μέση ηλικία 11.4 έτη). Η ομάδα των παιδιών με παλιά λοίμωξη περιελάμβανε 36 παιδιά, 17 άρρενα και 19 θήλεα, ηλικίας 0.5 με 18 ετών (μέση ηλικία 9.47 έτη) και η ομάδα των παιδιών χωρίς στοιχεία λοίμωξης αποτελούνταν από 33 παιδιά, 22 άρρενα και 11 θήλεα, ηλικίας 1.0 με 14 ετών (μέση ηλικία 6.58 έτη).

## 2.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Για τη μελέτη των πολυμορφισμών *mbl2*, *TNF-alpha*, *VDR ApaI* και *TaqI* έγινε απομόνωση γενωμικού DNA από ολικό αίμα. Η απομόνωση του γενετικού υλικού των παιδιών έγινε με εμπορικό κιτ, Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η διαδικασία βασίστηκε στη διάσπαση του πυρήνα των λευκοκυττάρων και των κυτταρικών μεμβρανών και στην απελευθέρωση του DNA σε διαλυτή μορφή, μετά το διαχωρισμό του από πρωτεΐνες και άλλα μακρομόρια. Η απομόνωση του DNA έγινε στα εξής στάδια:

1. Σε 400 μl ολικού αίματος, το οποίο μεταφέρθηκε από το φιαλίδιο της γενική αίματος (EDTA tube) σε eppendorf όγκου 1.5 ml έγινε προσθήκη 1200 μl Cell lysis Solution και το διάλυμα αναδεύτηκε με το χέρι για 10 δευτερόλεπτα.
2. Το διάλυμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για χρονικό διάστημα 10 λεπτών για τη λύση των ερυθροκυττάρων.
3. Έγινε φυγοκέντρηση στις 1500 RCF για 1 λεπτό. Απομακρύνθηκε το περισσότερο υπερκείμενο διάλυμα μετά τη φυγοκέντρηση (1000μl) και το ίζημα αναδεύτηκε με τη χρήση έντονου vortex, για την αναδιάλυση των λευκών αιμοσφαιρίων.
4. Προστέθηκαν 400μl Nuclei Lysis Solution και έγινε ανάδευση με την πιπέτα 5-6 φορές για να λυθούν τα λευκοκύτταρα (προέκυψε αφρώδες διάλυμα).
5. Στη συνέχεια προστέθηκαν 137μl Protein Precipitation Solution, με στόχο την απομάκρυνση των πρωτεϊνών και το διάλυμα αναδεύτηκε με τη χρήση vortex για 20 δευτερόλεπτα.
6. Έγινε φυγοκέντρηση στις 1500 RCF για 3 λεπτά, μετά την οποία έγινε ορατή μία σκούρα καφέ πελλέτα. Το υπερκείμενο τοποθετήθηκε σε καινούριο eppendorf όγκου 1.5 ml, στο οποίο προστέθηκαν 400μl ισοπροπανόλης που βρισκόταν σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Ακολούθησε ανάδευση με το χέρι για περίπου 1 λεπτό και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 1500 RCF, οπότε το DNA έγινε ορατό ως μία λευκή πελλέτα.
8. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου προστέθηκαν 400μl αιθανόλης 70% και το διάλυμα αναδεύτηκε απαλά με το χέρι.
9. Έγινε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, απομάκρυνση του υπερκείμενου και το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.

10. Στο DNA προστέθηκε 150μl Rehydration Solution, επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες και αποθηκεύτηκε στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.4 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION- PCR)**

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είναι τεχνική που οδηγεί στη δημιουργία πολλών αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA με ταχύτητα και ακρίβεια. Χρησιμοποιείται στην πειραματική μοριακή βιολογία, στην εξελικτική βιολογία, για την ιατρική διάγνωση και στην ιατροδικαστική.

Η τεχνική αναπτύχθηκε το 1983 από τον Αμερικανό βιοχημικό Kary B. Mullis. Βασίζεται στη φυσική διαδικασία που χρησιμοποιεί ένα κύτταρο να αντιγράφει μία νέα έλικα DNA και απαιτεί λίγα βιολογικά συστατικά. Ακόμα και ένα μόριο DNA του γονιδίου που περιέχει την περιοχή προς αντιγραφή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πλαίσιο. Η επιπρόσθετη πληροφορία που είναι απαραίτητη για την αντιγραφή είναι δύο υπομονάδες DNA (μικρές περιοχές νουκλεοτιδίων) από κάθε άκρο της περιοχής ενδιαφέροντος. Αυτά τα δύο τμήματα ονομάζονται εκκινητές (primers). Οι primers συνδέονται στις συμπληρωματικές τους θέσεις στο αρχικό πλαίσιο και αποτελούν θέση έναρξης της αντιγραφής. Η σύνθεση του DNA από τον ένα primer κατευθύνεται προς τον άλλο, οδηγώντας στην αντιγραφή του ενδιάμεσου τμήματος DNA. Για τη διαδικασία επίσης είναι απαραίτητα ελεύθερα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), τα οποία χρησιμοποιούνται για να δομηθούν οι νέες έλικες DNA και η πολυμεράση DNA (DNA polymerase), ένα θερμοανθεκτικό ένζυμο που επιτελεί τη δόμηση με τη διαδοχική προσθήκη των ελευθέρων νουκλεοτιδίων κατευθυνόμενη από το αρχικό πλαίσιο. Βασικά

στοιχεία της αντίδρασης αποτελούν επίσης το H<sub>2</sub>O, ρυθμιστικό διάλυμα και κατιόντα (κυρίως Mg<sup>2+</sup>) που δημιουργούν το κατάλληλο χημικό περιβάλλον για τη σταθερότητα της πολυμεράσης.

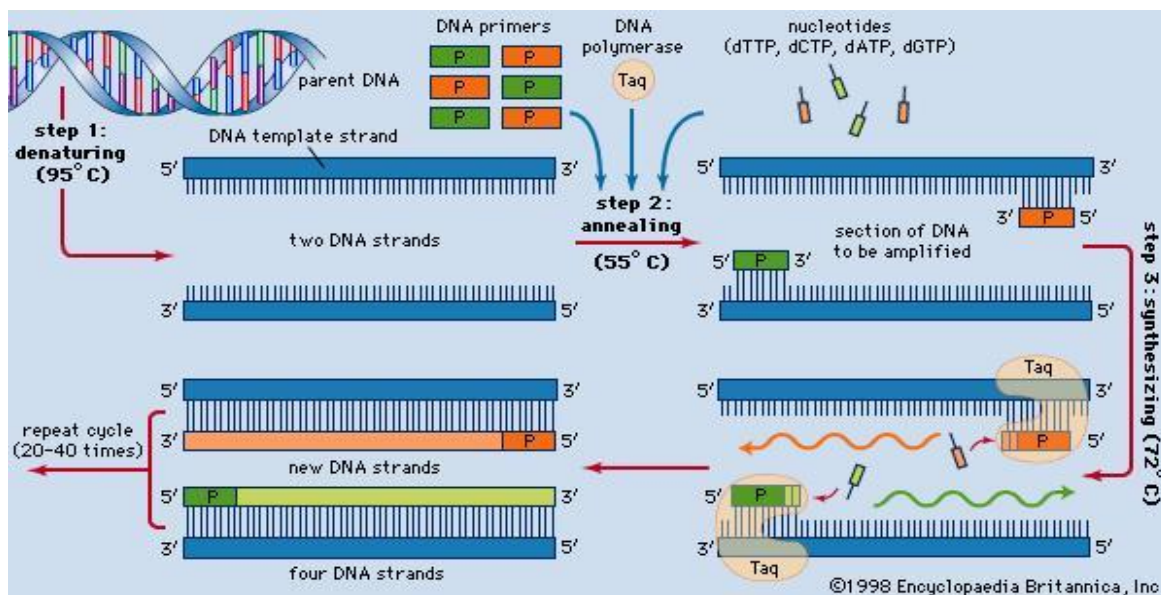
Η PCR είναι διαδικασία τριών βημάτων και γίνεται σε θερμικό κυκλοποιητή σε επαναλαμβανόμενους κύκλους, καθένας περιλαμβάνει τρία βήματα (εικόνα V):

**Αποδιάταξη DNA** Το αρχικό βήμα της αποδιάταξης, δηλαδή της αποσύνθεσης του μορίου του DNA σε δύο ξεχωριστές έλικες γίνεται με θέρμανση των αρχικών προϊόντων σε θερμοκρασία 95° C. Κάθε έλικα θα αποτελέσει το πλαίσιο σχηματισμού νέα έλικας.

**Σύνδεση των εκκινητών** Στο δεύτερο βήμα η θερμοκρασία μειώνεται στους 55°C- 65° C (η θερμοκρασία υβριδοποίησης εξαρτάται από την αλληλουχία του κάθε primer), έτσι ώστε κάθε primer μπορεί να συνδεθεί με την αρχική έλικα πλαίσιο στη συμπληρωματική του θέση.

**Επιμήκυνση κατά την 5'-3' κατεύθυνση** Στο τρίτο βήμα η θερμοκρασία αυξάνει στους 72°C και η πολυμεράση αρχίζει να συνδέει νουκλεοτίδια στο τέλος της αλληλουχίας των συνδεδεμένων primers. Στο τέλος κάθε κύκλου που διαρκεί περίπου 5 λεπτά, η θερμοκρασία αυξάνει και η διαδικασία ξεκινά από την αρχή. Ο αριθμός των αντιγράφων διπλασιάζεται μετά από κάθε κύκλο, μετά από n κύκλους προκύπτουν 2<sup>n</sup> αντίγραφα του αρχικού μορίου. Συνήθως αρκούν 25 με 30 κύκλοι για την παραγωγή επαρκούς ποσότητας DNA.

Εικόνα V. Τα βήματα της PCR



Κατά την πειραματική διαδικασία όλα τα απαραίτητα συστατικά διατηρούνται σε πάγο. Οι όγκοι των αντιδραστηρίων είναι οι εξής:

Για όγκο αντίδρασης 12.5μl τοποθετούνται σε eppendorf 12.1μl mastermix αντίδρασης, διάλυμα το οποίο αποτελείται από:

1.25 μl ρυθμιστικού διαλύματος (10x)

0.375 μl MgCl<sub>2</sub> (50 mM)

0.25 μl τριφωσφονικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων

9.5 μl H<sub>2</sub>O

0.3 μl από κάθε εκκινητή (10μM)

0.4 μl Taq πολυμεράσης (5 u/μl)

Το διάλυμα αναδεύεται με vortex, προστίθεται 0.4 μl DNA και τοποθετείται σε θερμικό κυκλοποιητή.

Για το σχεδιασμό των primers, χρησιμοποιήθηκε το cDNA των ανθρώπινων γονιδίων *mb12*, *TNF-alpha*, *VDR* που υπήρχε στην GenBank: για τους πολυμορφισμούς του *mb12 B* αλληλομόρφο στο εξόνιο 1, κωδικόνιο 54 (GGC σε GAC, accession ss3344470), *C* αλληλομόρφο στο εξόνιο 1, κωδικόνιο 57 (GGA σε GAA, accession ss48295540), και *X* αλληλομόρφο στη θέση -221 του υποκινητή (G σε C αντικατάσταση, ss38540952), η ποικιλία του υποκινητή του *TNF-alpha -308* (A σε G, accession 12691494) και *VDR ApaI* (G σε T) και *TaqI* (T σε C) δείκτες στα ιντρόνια 8 και 9, accessions ss78577228 και ss76496.

Τα προγράμματα του θερμικού κυκλοποιητή, το μέγεθος του PCR προϊόντος κάθε αντίδρασης και οι primers για τη μελέτη των παραπάνω πολυμορφισμών αναφέρονται παρακάτω:

***mb12* κωδικόνιο 54**

(5'-3) GTAGGACAGAGGGCATGCTC (forward)

(5'-3) CAGGCAGTTTCCTCTGGAAGG (reverse)

Μέγεθος προϊόντος PCR 329 bp

***mb12* κωδικόνιο 57**

(5'-3) GTAGGACAGAGGGCATGCTC (forward)

(5'-3) CAGGCAGTTTCCTCTGGAAGG (forward)

Μέγεθος προϊόντος PCR 329 bp



Για την ανάλυση του εξονίου 1 του *mbi2*, η αντίδραση περιελάμβανε 100ng γενωμικού DNA, 0.24μM από κάθε forward reverse primers, 0.2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5U DNA Taq Polymerase (Invitrogen). Τα αντιδραστήρια υπέστησαν αρχική θέρμανση στους 94 βαθμούς για 5 λεπτά, 32 κύκλους αποδιάταξης στους 94 βαθμούς για 30 δευτερόλεπτα, σύνδεση στους 61 βαθμούς για 30 δευτερόλεπτα και επέκταση στους 72 βαθμούς για 10 λεπτά.

#### ***mbi2* -221 promoter**

(5'-3) CCGAAGAGGACATGGAGAGA (forward)

(5'-3) TCATCTGTGCCTAGACACCTG (Reverse)

Μέγεθος προϊόντος PCR 181bp

#### ***TNF-alpha* -308**

(5'-3') AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT

(5'-3) TCCTCCCTGCTCCGATTCCG

Μέγεθος προϊόντος PCR 108bp

Για τον πολυμορφισμό *TNF-alpha* -308 G/A, 0.24μM από κάθε forward reverse primers προστέθηκαν σε 0.2 mM dNTPs, 1x buffer αντίδρασης (Invitrogen), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5U DNA Taq Polymerase (Invitrogen) και 100 ng γενωμικού DNA προς σχηματισμό τελικού ποσού αντίδρασης 12.5 μl. Τα αντιδραστήρια ετέθησαν σε αρχική θέρμανση στους 95 βαθμούς για 3 λεπτά, 33 κύκλους αποδιάταξης στους 94 βαθμούς για 30 δευτερόλεπτα,

επανασύνδεση στους 57 βαθμούς για 30 δευτερόλεπτα και επέκταση στους 72 βαθμούς για 45 δευτερόλεπτα και τελική επιμήκυνση στους 72 βαθμούς για 5 λεπτά.

#### ***VDR ApaI***

(5'-3') CAGAGCATGGACAGGGAGCAA

(5'-3) GCAACTCCTCATGGCTGAGGTC

Μέγεθος προϊόντος PCR 740bp

#### ***VDR TaqI***

(5'-3') CAGAGCATGGACAGGGAGCAA

(5'-3) GCAACTCCTCATGGCTGAGGTC

Μέγεθος προϊόντος PCR 740bp

Οι πολυμορφισμοί *VDR ApaI* και *TaqI* αναλύθηκαν με το ίδιο ζεύγος primers με δύο διαφορετικές αντιδράσεις περιοριστικής κοπής. Το PCR προϊόν έκτασης 740bp του γονιδίου του υποδοχέα ελήφθη μετά από ενίσχυση με PCR, με αρχική θέρμανση στους 94 βαθμούς για 5 λεπτά, ακολουθούμενη από 35 κύκλους αποδιάταξης στους 94 βαθμούς για 30 δευτερόλεπτα, ανασύνθεσης στους 70 βαθμούς για 30 δευτερόλεπτα, επέκτασης στους 72 βαθμούς για 45 δευτερόλεπτα και τελικής επέκτασης στους 72 βαθμούς για 5 λεπτά. Ένας συνολικός όγκος αντίδρασης 12.5 μl περιείχε 100 ng γενωμικού DNA, 0.24 μM από κάθε primer, 0.2 mM από κάθε dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, standard PCR buffer και 0.5 U Taq polymerase (Invitrogen).

Για τα αλληλόμορφα του γονιδίου του VDR χρησιμοποιήθηκε η υπάρχουσα ονοματολογία [64]. Σύμφωνα με αυτή η παρουσία θέσης κοπής σηματοδοτούσε το αλληλόμορφο με το μικρό γράμμα (a και t) και η απουσία της το κεφαλαίο γράμμα (A και T).

## **2.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ PCR ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ**

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται για να διαχωρίσει τμήματα DNA με βάση το μέγεθος τους. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης. Η αγαρόζη είναι ουσία που δημιουργεί ένα πορώδες, στερεό υπόστρωμα, στο οποίο εισάγονται τα DNA σε θέσεις υποδοχείς (πηγάδια). Το πήκτωμα υπόκειται σε ηλεκτρικό πεδίο. Το DNA που είναι αρνητικά φορτισμένο μετακινείται προς το θετικό πόλο. Η ταχύτητα μετακίνησης του εξαρτάται από το μέγεθος του, όσο μεγαλύτερο είναι το θραύσμα τόσο πιο αργά κινείται στο πήκτωμα.

Τα πήκτωμα αγαρόζης κατασκευάζονται σε διάφορες συγκεντρώσεις, ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που χρειάζεται να διαχωριστούν. Έτσι ανάλογα με τη συγκέντρωση του πηκτώματος προστίθεται και η ποσότητα αγαρόζης. Το διάλυμα της αγαρόζης παρασκευάζεται σε TBE 1x μετά από θέρμανση μερικών λεπτών. Αφού διαλυθεί η αγαρόζη και σχηματιστεί ομοιογενές διάλυμα, προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (0.5 μg/ml), το οποίο προκαλεί το φθορισμό του DNA όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία. Το διάλυμα αφού κρυώσει τοποθετείται στο εκμαγείο, όπου δημιουργούνται οι θέσεις υποδοχείς (πηγαδάκια) των DNA με ειδικά 'χτενάκια' και μετά από επώαση 30 λεπτών περίπου σε θερμοκρασία δωματίου δημιουργείται το πήκτωμα.

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε ειδική συσκευή που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1x (Tris-Base, βορικό οξύ, EDTA και αποσταγμένο νερό). Στην άνοδο και στην κάθοδο της

συσκευής εισάγονται τα αντίστοιχα ηλεκτρόδια που συνδέονται με συσκευή παροχής ρεύματος. Στα πηγαδάκια τοποθετούνται 5μl από το προϊόν και 2μl χρωστικής για την παρακολούθηση της κίνησης του DNA μέσα στο πήκτωμα. Σε ένα πηγαδάκι τοποθετείται ο θετικός μάρτυρας- Ladder (τμήματα γνωστού μεγέθους) και σε ένα το αρνητικό control για ανίχνευση ενδεχόμενης επιμόλυνσης των δειγμάτων. Όλα τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε 1% gel αγαρόζης.

## **2.6 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΑ ΜΗΚΟΥΣ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΗΣ ΚΟΠΗΣ (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM, RFLP) ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΠΕΨΗΣ**

RFLP είναι η μέθοδος αναζήτησης διαφορών στην αλληλουχία ομόλογων περιοχών DNA, μέσω της ανίχνευσης θραυσμάτων DNA διαφορετικού μήκους προερχόμενα από πέψη των αρχικών αλληλουχιών με ειδικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Οι μονοσημειακές αλλαγές που αναζητούνται στους υπό εξέταση πολυμορφισμούς δημιουργούν αλλαγή του σημείου κοπής (δημιουργία νέας θέσης ή κατάργηση θέσης κοπής) της ενδονουκλεάσης. Έτσι έμμεσα από την ανίχνευση των θραυσμάτων ή των άκοπων τμημάτων αναγνωρίζονται οι μεταλλαγές. Τα βήματα της πέψης είναι τα εξής:

Σε eppendorf 0.5ml προστίθενται 4μl PCR προϊόντος, 1μl ρυθμιστικού διαλύματος (buffer ενζύμου) και 0.3μl περιοριστικού ενζύμου μέχρι τελικού όγκου διαλύματος 10μl. Το διάλυμα επωάζεται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία και για χρονικό διάστημα, ειδικά για κάθε περιοριστικό ένζυμο.

Τα τμήματα του DNA που δημιουργούνται διαχωρίζονται με την ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης πυκνότητας που καθορίζεται από το μέγεθος των αναμενόμενων θραυσμάτων. Στο gel φορτώνονται επίσης ο Ladder και μάρτυρας (wild type-ομόζυγο τμήμα γονιδίου). Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες, το μέγεθος των αναμενόμενων θραυσμάτων και οι πυκνότητες των πηκτωμάτων αγαρόζης αναγράφονται παρακάτω:

***mbl2*, εξόνιο 1, Κωδικόνιο 54**

Περιοριστική ενδονουκλεάση: BanI, New England Biolabs

Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 3%

Τμήματα μετά από την πέψη μήκους 245 bp και 84 bp

Γονότυπος GG: 245 bp, 84 bp

Γονότυπος GA: 329 bp, 245 bp, 84 bp

Γονότυπος AA: 329 bp

***mbl2*, εξόνιο 1, Κωδικόνιο 57**

Περιοριστική ενδονουκλεάση: MboII, New England Biolabs

Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 3%

Τμήματα μετά από την πέψη μήκους 254 και 75 bp

Γονότυπος GG: 254, 75 bp

Γονότυπος GA: 329 bp, 254, 75 bp

Γονότυπος AA: 329 bp

***mbl2*, υποκινητής -221**

Περιοριστική ενδονουκλεάση: BtgI, New England Biolabs, επώαση 37°C overnight

Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 2.5%

Τμήματα μετά από την πέψη μήκους 122 και 59 bp

Γονότυπος GG: 122bp και 59 bp

Γονότυπος GC: 181bp, 122 και 59 bp

Γονότυπος CC: 181bp

### ***TNF-alpha -308***

Περιοριστική ενδονουκλεάση: NcoI, New England Biolabs, επώαση 37°C overnight

Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 4%

Τμήματα μετά από την πέψη μήκους 83 και 25bp

Γονότυπος GG: 83bp, 25bp

Γονότυπος GA: 108bp, 83bp, 25bp

Γονότυπος AA: 108bp

### ***VDR ApaI***

Περιοριστική ενδονουκλεάση: ApaI (PromegaCorp, Madison, WI), επώαση 37°Covernight

Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 1.5%

Τμήματα μετά από την πέψη μήκους 83 και 25bp

Γονότυπος TT: 210 και 530 bp

Γονότυπος GT: 740 bp, 210 bp και 530 bp

Γονότυπος GG: 740bp

### ***VDR TaqI***

Περιοριστική ενδονουκλεάση: TaqI (PromegaCorp, Madison, WI), επώαση 65°C για 2 ώρες

Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 3.5%

Τμήματα μετά από την πέψη μήκους 245 bp, 290 bp και 205 bp

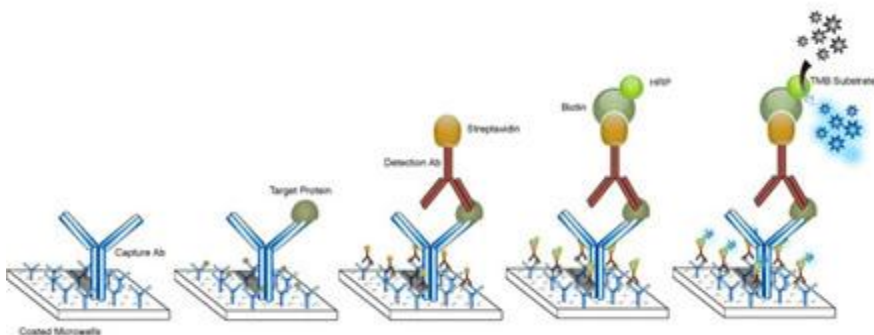
Γονότυπος CC: 245 bp, 290 bp και 205 bp

Γονότυπος TC: 495 bp, 245 bp, 290 bp και 205 bp

Γονότυπος TT: 245 bp και 495 bp

### **2.7 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ MBL ΜΕ ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)**

Τα επίπεδα MBL του ορού μετρήθηκαν με τη μέθοδο του ανοσοενζυμικού προσδιορισμού ELISA (HyCult, Urden, Netherlands). Η ELISA είναι μέθοδος που στηρίζεται στην αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος και την αναγνώριση του συμπλέγματος με τη χρήση ενζύμου, το οποίο συντελεί στην αλλαγή χρώματος αντίστοιχη με την ποσότητα της υπό προσδιορισμό πρωτεΐνης. Η διαδικασία βασίζεται στη σύνδεση των αντιγόνων του δείγματος με αντισώματα του τρυβλίου, τα οποία είναι συνδεδεμένα με ένζυμο. Σε δεύτερη φάση προστίθεται το υπόστρωμα του ενζύμου στο διάλυμα και παρατηρείται αλλαγή χρώματος ανάλογη της συγκέντρωσης της μετρούμενης πρωτεΐνης μετά την αντίδραση ενζύμου-υποστρώματος. Έτσι η τεχνική βασίζεται στη μέθοδο sandwich (Εικόνα VI).



**Εικόνα VI.** Σχηματική απεικόνιση της ELISA

Προστέθηκε 150μl ρυθμιστικό διάλυμα ενεργοποίησης μαννόζης σε βοθρία πλάκας ELISA 96 θέσεων, τα οποία στον πυθμένα τους περιείχαν μαννόζη. Μετά από επώαση 30 λεπτών στους 37°C, έκπλυση του υπερκείμενου (τέσσερις φορές, με προσθήκη 200 μl wash buffer), προστέθηκαν σε κάθε βοθρίο 100 μl από κάθε υπό εξέταση δείγμα και δείγμα αναφοράς γνωστής συγκέντρωσης MBL. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 60 λεπτά για τη σύνδεση της MBL των υπερκειμένων με τη μαννόζη του πυθμένα. Έγινε έκπλυση με τον προαναφερόμενο τρόπο και προσθήκη 100 μl βιοτινυλιωμένου αντισώματος. Μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 60 λεπτά, στα οποία το αντίσωμα συνδέθηκε με την ακινητοποιημένη MBL, ακολούθησε έκπλυση και προσθήκη 100 μl ενζύμου (Streptavidin-peroxidase), επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 60 λεπτά για τη σύνδεση του αντισώματος με το ένζυμο και απομάκρυνση με έκπλυση της περίσσειας αντισώματος-ενζύμου. Στα βοθρία προστέθηκαν 100 μl υποστρώματος του ενζύμου (TMB solution) μαζί με χρωμογόνο, το οποίο οξειδωνόταν με την αντίδραση του με το ένζυμο στο σκοτάδι και γινόταν εμφανές μπλε χρώμα μετά από επώαση περίπου 30 λεπτών. Στη συνέχεια προστέθηκε κιτρικό οξύ για τη διακοπή της αντίδρασης και έγινε αλλαγή του χρώματος από μπλε σε κίτρινο. Η ένταση του χρώματος ήταν ανάλογη με το ποσό του ενζύμου που



ήταν συνδεδεμένο με την MBL, το οποίο ήταν ανάλογο με την ποσότητα της λεκτίνης στον ορό των δειγμάτων. Η οπτική απορρόφηση σε κάθε βοθρίο μετρήθηκε με το φασματοφωτόμετρο στα 450 nm. Σχηματίστηκε η καμπύλη αναφοράς από τις τιμές της απορρόφησης των προτύπων διαλυμάτων με βάση τις αντίστοιχες γνωστές συγκεντρώσεις τους. Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων εισάγοντας τις μετρηθείσες τιμές της απορρόφησης στην εξίσωση της καμπύλης αναφοράς.

Με την ELISA μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις MBL σε δείγματα ορού από 28 παιδιά με χρόνια λοίμωξη, 32 με δείκτες παλιάς λοίμωξης και 16 παιδιά ομάδας ελέγχου σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και την εμπειρία του εργαστηρίου μας [78]. Τα επίπεδα MBL ορίστηκαν χαμηλά όταν ήταν  $<500\text{ng/ml}$  και φυσιολογικά όταν ήταν  $\geq 500\text{ng/ml}$  [29].

### **3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ**

Η υπολογιζόμενη συχνότητα των γονοτύπων στον πληθυσμό σε σχέση με την αναμενόμενη σύμφωνα με την ισορροπία Hardy Weinberg μελετήθηκε με το κριτήριο  $\chi^2$  για όλους τους πολυμορφισμούς.

Η στατιστική ανάλυση έγινε με το SPSS 20.0 (Statistical Package for the Social Sciences). Οι συχνότητες των αλληλομόρφων, των γονοτύπων, των απλοτύπων και των επιπέδων MBL συγκρίθηκαν μεταξύ των παιδιών με χρόνια και παλιά λοίμωξη με την ομάδα ελέγχου (παιδιά χωρίς λοίμωξη) με one-tailed Fisher's exact probability test και υπολογίστηκαν τα risk ratios (RR) και τα κατά 95% confidence intervals (CI 95%). Το Fisher's exact probability χρησιμοποιήθηκε γιατί σε μερικές συγκρίσεις ο αναμενόμενος αριθμός (expected count) ήταν μικρότερος του 5 σε ποσοστό πάνω από 20%. Τιμές  $P < 0.05$  θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

## **4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **4.1 Φύλο και HBV λοίμωξη**

Για τη διερεύνηση της συσχέτισης του φύλου με την πρόιμη λοίμωξη από HBV υπολογίστηκαν οι συχνότητες των θηλέων και αρρένων ατόμων σε κάθε ομάδα. Υπολογίστηκε η διαφορά συχνοτήτων σε σχέση με τον κίνδυνο να αναπτύξουν λοίμωξη (ομάδα ατόμων με χρόνια και παρελθούσα λοίμωξη vs. υγιών παιδιών) (77.6% vs. 58.5%;  $p=0.032$ ;  $RR=1.33$ ,  $CI\ 1.00-1.74$ ) και σε σχέση με τον κίνδυνο μετάβασης σε χρονιότητα (ομάδα ατόμων με χρόνια vs. ατόμων με παρελθούσα λοίμωξη) (50.0% vs. 45.2%;  $p=0.44$ ). Βρέθηκε λοιπόν ότι τα θήλεα άτομα είχαν μεγαλύτερο κίνδυνο να αποκτήσουν την λοίμωξη από τα αρρένα άτομα αλλά δεν είχαν διαφορετική πιθανότητα να αναπτύξουν χρόνια νόσο.

### **4.2 MBL και HBV λοίμωξη**

Για τη διερεύνηση της συσχέτισης των πολυμορφισμών στα κωδικόνια 54, 57 του εξονίου και στη θέση -221 υπολογίστηκαν οι συχνότητες των γονοτύπων σε παιδιά με χρόνια λοίμωξη, παιδιά με παρελθούσα λοίμωξη και υγιή παιδιά (πίνακας II).

#### **Πολυμορφισμός 54G/A**

Παιδιά με χρόνια λοίμωξη: Γονότυπος (GG) 26 , γονότυπος (GA) 7 και γονότυπος (AA) 0

Παιδιά με παρελθούσα λοίμωξη: Γονότυπος (GG) 29 , γονότυπος (GA) 6 και γονότυπος (AA) 1

Υγιή παιδιά ελέγχου: Γονότυπος (GG) 27 , γονότυπος (GA) 6 και γονότυπος (AA) 0

Το αλληλίο B στο κωδικόνιο 54 ανιχνεύτηκε με συχνότητα 10.3%. Δεν υπήρχαν αποκλίσεις από την ισορροπία Hardy-Weinberg για καμία από τις επιμέρους ομάδες, ούτε για το συνολικό δείγμα ( $p=0.49$ ).

Έγινε σύγκριση των συχνοτήτων των γονοτύπων καθώς και των αλληλίων κάθε ομάδας με τις υπόλοιπες με τη χρήση του Fisher's exact probability test. Η σύγκριση των γονοτύπων και των αλληλίων και η συσχέτιση τους με τον κίνδυνο να αναπτύξει το παιδί λοίμωξη όταν έρθει σε επαφή με τον ιό (ομάδα παιδιών με παλιά και χρόνια λοίμωξη vs. ομάδα υγιών παιδιών) δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p=0.45$ , RR 1.19, 95% CI 0.49-2.94). Επίσης δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση, η σύγκριση των διαφορετικών συχνοτήτων με την έκβαση της λοίμωξης δηλαδή τη μετάβαση σε χρόνια νόσο ή την αποβολή του ιού (ομάδα χρόνιας νόσου vs. ομάδας παρελθούσας λοίμωξης) ( $p=0.57$ , RR1.04, 95% CI 0.40-2.73).

### **Πολυμορφισμός 57G/A**

Παιδιά με χρόνια λοίμωξη: Γονότυπος (GG) 32 , γονότυπος (GA) 1 και γονότυπος (AA) 0

Παιδιά με παρελθούσα λοίμωξη: Γονότυπος (GG) 36, γονότυπος (GA) 0 και γονότυπος (AA) 0

Υγιή παιδιά ελέγχου: Γονότυπος (GG) 31 , γονότυπος (GA) 2 και γονότυπος (AA) 0

Το αλληλόμορφο C στο κωδικόνιο 57 ανιχνεύτηκε με συχνότητα 1.5%. Δεν υπήρχαν αποκλίσεις από την ισορροπία Hardy-Weinberg για καμία από τις επιμέρους ομάδες, ούτε για το συνολικό δείγμα ( $p=0.93$ ).

Η σύγκριση των γονοτύπων και των αλληλίων και η συσχέτιση τους με τον κίνδυνο να αναπτύξει το βρέφος λοίμωξη όταν έρθει σε επαφή με τον ιό (ομάδα παιδιών με παλιά και χρόνια λοίμωξη vs. ομάδα υγιών παιδιών) δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση

( $p=0.25$ , RR 4.18, 95%CI 0.38-45.29). Η συσχέτιση των διαφορετικών συχνοτήτων με την έκβαση της λοίμωξης, δηλαδή τη μετάβαση σε χρόνια νόσο ή την αποβολή του ιού (ομάδα χρόνιας νόσου vs. ομάδα παρελθούσας λοίμωξης) δεν ήταν εφικτή λόγω μη ανεύρεσης γονοτύπων AA και GA σε κάποιο από τα παιδιά της ομάδας με παρελθούσα λοίμωξη.

### **Πολυμορφισμός -221X/Y**

Παιδιά με χρόνια λοίμωξη: Γονότυπος (YY) 20, γονότυπος (XY) 11 και γονότυπος (XX) 2

Παιδιά με παρελθούσα λοίμωξη: Γονότυπος (YY) 21, γονότυπος (XY) 13 και γονότυπος (XX) 2

Υγιή παιδιά ελέγχου: Γονότυπος (YY) 21, γονότυπος (XY) 6 και γονότυπος (XX) 5

Το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο X της θέσης -221 ανιχνεύτηκε με συχνότητα 23.8%. Δεν υπήρχε απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg για το συνολικό δείγμα ( $p=0.77$ ), εντούτοις υπήρχε απόκλιση για την ομάδα ελέγχου ( $p=0.05$ ).

Η σύγκριση των γονοτύπων και των αλληλίων και η συσχέτιση τους με τον κίνδυνο να αναπτύξει το βρέφος λοίμωξη όταν έρθει σε επαφή με τον ιό (ομάδα παιδιών με παλιά και χρόνια λοίμωξη vs. ομάδα υγιών παιδιών) δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p=0.45$ , RR1.08, 95%CI 0.63-1.82). Επίσης η σύγκριση των διαφορετικών συχνοτήτων με την έκβαση της λοίμωξης δηλαδή τη μετάβαση σε χρόνια νόσο ή την αποβολή του ιού (ομάδα χρόνιας νόσου vs. ομάδα παρελθούσας λοίμωξης) δεν ανέδειξε στατιστική σημαντική συσχέτιση ( $p=0.53$ , RR 1.04, 95%CI 0.56-1.91).

### **Απλότυποι *mbl2***

Στη μελέτη των απλοτύπων, συμπεριλήφθησαν όλα τα δείγματα. Η παρουσία μεταλλαγμένου αλληλομόρφου στα κωδικόνια 54 (B) ή 57 (C) του εξονίου, αντιπροσωπεύτηκε ως O αλληλόμορφο. Λόγω της ύπαρξης γνωστής «ανισορροπίας

σύνδεσης» μεταξύ των μεταλλαγών του εξονίου και του υποκινητή, το μεταλλαγμένο αλληλίο *X* της θέσης -221 συνδυαζόταν μόνο με αλληλίο άγριου τύπου στα κωδικόνια 54 και 57. Συνεπώς ο καθορισμός των ομολόγων χρωμοσωμάτων για τα ετερόζυγα άτομα με συνδυαστικό γονότυπο *AOXY* ήταν εφικτός, καθώς το άτομο αυτό μπορούσε να φέρει μόνο ένα συνδυασμό απλοτύπων: *AX* και *YO*. Επίσης η παρουσία ενός μεταλλαγμένου αλληλομόρφου στη θέση του εξονίου *B* ή *C* (ομαδοποιημένα ως *O* αλληλομόρφου) καθιστούσε την ύπαρξη *X/Y* αλληλίου στη θέση -221 του υποκινητή μικρότερης σημασίας για τον καθορισμό των επιπέδων MBL του ορού και το αλληλίο του υποκινητή μπορούσε να παραληφθεί. Έτσι κατά την ομαδοποίηση των απλοτύπων με βάση την έκφραση τους διαμορφώθηκαν δύο ομάδες σύγκρισης: απλότυποι υψηλής έκφρασης *YA/YA*, *YA/XA*, *XA/XA* και απλότυποι χαμηλής έκφρασης *YA/O*, *XA/O*, *O/O* σε συμφωνία με υπάρχοντα δεδομένα [83]. Η συσχέτιση των δύο ομάδων απλοτύπων με τον κίνδυνο ανάπτυξης HBV λοίμωξης μετά την έκθεση (ομάδα παιδιών με χρόνια και παρελθούσα λοίμωξη vs. ομάδα υγιών παιδιών) και με τον κίνδυνο ανάπτυξης χρόνιας νόσου (ομάδα παιδιών με χρόνια λοίμωξη vs. παιδιών με παρελθούσα λοίμωξη) δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα ( $p=0.52$ , RR 1.08, 95%CI 0.48-2.41 και  $p=0.55$ , RR 1.09, 95%CI 0.42-2.78 αντίστοιχα).

### **Επίπεδα MBL**

Χαμηλά επίπεδα MBL (<500ng/ml) βρέθηκαν στο 13.2% του ολικού πληθυσμού, σε 10.7% των παιδιών με χρόνια λοίμωξη, 15.6% των παιδιών με παλιά λοίμωξη και 12.5% των παιδιών χωρίς καμία ένδειξη λοίμωξης. Η κατανομή των χαμηλών και των φυσιολογικών ( $\geq 500$ ng/ml) επιπέδων της λεκτίνης δε διέφερε ανάμεσα στις ορολογικές ομάδες (παιδιά με χρόνια και παρελθούσα λοίμωξη vs. υγιή παιδιά,  $p=0.66$ , RR 1.05,

95%CI 0.24-4.47, παιδιά με χρόνια vs. παιδιά με παρελθούσα λοίμωξη,  $p=0.47$ , RR 1.36, 95%CI 0.35-5.19).

**Πίνακας II.** Κατανομή των γονοτύπων των αλληλίων και των απλοτύπων του εξονίου 1 και του υποκινητή του γονιδίου της MBL σε 102 παιδιά που γεννήθηκαν από HBV θετικές μητέρες: 33 με χρόνια λοίμωξη, 36 με αυτόματη αποβολή του ιού και 33 υγιή παιδιά.

<i>mbl2</i> SNP	HWE <sup>a</sup>	Total	HBsAg	HBsAg	HBV
	<i>p</i> -value	N (%)	persistence	clearance	naïvity
			N (%)	N (%)	(%)
<b>Condon 54</b>					
<b>Genotype</b>					
AA	0.49	1 (1.0)	0 (0.0)	1 (2.8)	0 (0.0)
GA	(0.70)	19 (18.6)	7 (21.2)	6 (16.7)	6 (18.2)
GG		82 (80.4)	26 (78.8)	29 (80.6)	27(81.8)
<b>Alleles</b>					
A		21 (10.3)	7 (10.6)	8 (11.1)	6 (9.1)
G		183 (89.7)	59 (89.4)	64 (88.9)	60 (90.9)
<b>Codon 57</b>					
<b>Genotype</b>					
AA	0.93	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
GA	(0.90)	3 (2.9)	1 (3.0)	0 (0.0)	2 (6.1)
GG		99 (97.1)	32 (97.0)	36 (100.0)	31 (93.9)
<b>Alleles</b>					
A		3 (1.5)	1 (1.5)	0 (0.0)	2 (3.0)
G		201 (98.5)	65 (98.5)	72 (100)	64 (97.0)
<b>Promoter221</b>					
<b>Genotype</b>					

<i>XX</i>	0.77	9 (8.8)	2 (6.1)	2 (5.6)	5 (15.6)
<i>XY</i>	(0.05)	30 (29.4)	11 (33.3)	13 (36.1)	6 (18.8)
<i>YY</i>		62 (60.8)	20 (60.6)	21 (58.3)	21 (65.6)
<b>Alleles</b>					
<i>X</i>		48 (23.8)	15 (22.7)	17 (23.6)	16 (25.0)
<i>Y</i>		154 (76.2)	51 (77.3)	55 (76.4)	48 (75.0)
<b>Haplotypes</b>					
<i>YA/YA</i>		48 (47.5)	15 (45.5)	18 (50.0)	15 (46.9)
<i>YA/XA</i>		26 (25.7)	9 (27.3)	11 (30.6)	6 (18.8)
<i>XA/XA</i>		6 (5.9)	2 (6.1)	0 (0.0)	4 (12.5)
<i>YA/O</i>		11 (10.9)	4 (12.1)	2 (5.6)	5 (15.6)
<i>XA/O</i>		7 (6.9)	2 (6.1)	4 (11.1)	1 (3.1)
<i>O/O</i>		3 (3.0)	1 (3.0)	1 (2.8)	1 (3.1)

---

<sup>a</sup> Hardy Weinberg equilibrium; *p* values for patients (values for controls in parenthesis)

### 4.3 *TNF-α* -308 και HBV λοίμωξη

Για τη διερεύνηση της συσχέτισης του πολυμορφισμού *TNF-α* -308 υπολογίστηκαν οι συχνότητες των γονοτύπων σε παιδιά με χρόνια λοίμωξη, παιδιά με παρελθούσα λοίμωξη και υγιή παιδιά (πίνακας III).

#### Πολυμορφισμός -308 G/A

Παιδιά με χρόνια λοίμωξη: Γονότυπος (GG) 30, γονότυπος (GA) 3 και γονότυπος (AA) 0

Παιδιά με παρελθούσα λοίμωξη: Γονότυπος (GG) 31, γονότυπος (GA) 3 και γονότυπος (AA) 2



Υγιή παιδιά ελέγχου: Γονότυπος (GG) 25, γονότυπος (GA) 3 και γονότυπος (AA) 3

Τα αλληλόμορφο G της θέσης -308 ανιχνεύτηκε με συχνότητα 90.5%. Δεν παρατηρήθηκε απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg για το συνολικό δείγμα ( $p=0.78$ ), αλλά εμφανίστηκε απόκλιση για τις ομάδες παρελθούσας λοίμωξης και ομάδα ελέγχου ( $p=0.001$  και  $p<0.001$  αντίστοιχα).

Η σύγκριση των γονοτύπων και των αλληλίων και η συσχέτιση τους με τον κίνδυνο να αναπτύξει το παιδί λοίμωξη όταν έρθει σε επαφή με τον ιό (ομάδα παιδιών με παλιά και χρόνια λοίμωξη vs. ομάδα υγιών παιδιών) ανέδειξε συσχέτιση, η οποία δεν έφτασε το όριο στατιστικής σημαντικότητας (92.8% vs. 85.5%; RR1.09, 95% CI 0.97-1.21;  $p$  0.089). Η συσχέτιση των διαφορετικών συχνοτήτων με την έκβαση της λοίμωξης δηλαδή τη μετάβαση σε χρόνια νόσο ή την αποβολή του ιού (ομάδα χρόνιας νόσου vs. ομάδας παρελθούσας λοίμωξης) δεν ανέδειξε στατιστική σημαντική συσχέτιση ( $p=0.2$ , RR 2.14, 95%CI 0.58-7.93), ωστόσο η σύγκριση των αλληλομόρφων του *TNF-alpha* μεταξύ της ομάδας των παιδιών με χρόνια λοίμωξη και παιδιών χωρίς λοίμωξη έδειξε ότι τα παιδιά με χρόνια λοίμωξη φέρουν συχνότερα το αλληλόμορφο G (95.5% vs. 85.5%; RR 1.12, 95% CI 1.0-1.25;  $p=0.050$ ).

**Πίνακας III.** Κατανομή των συχνοτήτων των γονοτύπων και των αλληλίων του TNF-alpha -308 σε 102 children που γεννήθηκαν από HBV θετικές μητέρες: 33 με χρόνια HBV λοίμωξη, 36 με αυτόματη αποβολή του ιού και 33 υγιή παιδιά.

Polymorphism	HWE <sup>a</sup>	Total	HBsAg	HBsAg	HBV
	<i>p</i> -value		persistence	clearance	naïvity
			(%)	(%)	(%)

### 308G/A

#### Genotype

AA	0.78	5 (4.9)	0 (0.0)	2 (5.6)	3 (9.7)
GA	(0)	9 (8.8)	3 (9.1)	3 (8.3)	3 (9.7)
GG		86 (84.3)	30 (90.9)	31 (86.1)	25 (80.6)

#### Alleles

A		19 (9.5)	3 (4.5)	7 (9.7)	9 (14.5)
G		181 (90.5)	63 (95.5)	65 (90.3)	53 (85.5)

<sup>a</sup> Hardy-Weinberg equilibrium; p values for patients (values for controls in parenthesis)

#### 4.4 VDR και HBV λοίμωξη

Για τη διερεύνηση της συσχέτισης των πολυμορφισμών *VDR ApaI* and *TaqI* υπολογίστηκαν οι συχνότητες των γονοτύπων σε παιδιά με χρόνια λοίμωξη, παιδιά με παρελθούσα λοίμωξη και υγιή παιδιά (πίνακας IV).

##### VDR *ApaI*

Παιδιά με χρόνια λοίμωξη: Γονότυπος (GG) 14, γονότυπος (GT) 15 και γονότυπος (TT) 4

Παιδιά με παρελθούσα λοίμωξη: Γονότυπος (GG) 9, γονότυπος (GT) 19 και γονότυπος (TT) 8

Υγιή παιδιά ελέγχου: Γονότυπος (GG) 13, γονότυπος (GT) 14 και γονότυπος (TT) 6

Δεν υπήρχαν αποκλίσεις από την ισορροπία Hardy-Weinberg για καμία από τις επιμέρους ομάδες, ούτε για το συνολικό δείγμα ( $p=0.99$ ).

Το α αλληλίο της θέσης *ApaI* ανιχνεύτηκε με συχνότητα 41.2%. Η σύγκριση των γονοτύπων και των αλληλίων και η συσχέτιση τους με τον κίνδυνο να αναπτύξει λοίμωξη το παιδί όταν έρθει σε επαφή με τον ιό (ομάδα παιδιών με παλιά και χρόνια λοίμωξη vs.

ομάδα υγιών παιδιών) δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p=0.42$ , RR 1.08 95%CI 0.71-1.62). Το αλληλόμορφο *VDR ApaI A* βρέθηκε πιο συχνά σε παιδιά με χρόνια λοίμωξη σε σύγκριση με τα παιδιά με παλιά λοίμωξη, παρόλο που το εύρημα δεν έφτασε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (65.21% vs. 51.4%; RR 1.27, 95% CI 0.95-1.67;  $p=0.071$ ).

### **VDR *TaqI***

Παιδιά με χρόνια λοίμωξη: Γονότυπος (TT) 8, γονότυπος (TC) 16 και γονότυπος (CC) 9

Παιδιά με παρελθούσα λοίμωξη: Γονότυπος (TT) 11, γονότυπος (TC) 19 και γονότυπος (CC) 6

Υγιή παιδιά ελέγχου: Γονότυπος (TT) 10, γονότυπος (TC) 15 και γονότυπος (CC) 8

Τα αλληλίο *t* της θέσης *TaqI* ανιχνεύτηκε με συχνότητα 47.1%. Δεν υπήρχαν αποκλίσεις από την ισορροπία Hardy-Weinberg για καμία από τις επιμέρους ομάδες, ούτε για το συνολικό δείγμα ( $p=0.86$ ).

Η σύγκριση των γονοτύπων και των αλληλίων και η συσχέτιση τους με τον κίνδυνο να αναπτύξει το παιδί λοίμωξη όταν έρθει σε επαφή με τον ιό (ομάδα παιδιών με παλιά και χρόνια λοίμωξη vs. ομάδα υγιών παιδιών) δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p=0.55$ , RR 1.0, 95%CI 0.73-1.37). Επίσης η συσχέτιση των διαφορετικών συχνοτήτων με την έκβαση της λοίμωξης δηλαδή τη μετάβαση σε χρόνια νόσο ή την αποβολή του ιού (ομάδα χρόνιας νόσου vs. ομάδας παρελθούσας λοίμωξης) δεν ανέδειξε στατιστική σημαντική συσχέτιση ( $p=0.21$ , RR 1.18, 95%CI 0.85-1.63).

### **Απλότυποι VDR**

Οι δείκτες *TaqI* και *ApaI* βρέθηκαν να είναι σε «ανισορροπία σύνδεσης», σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες [84]. Τρεις συνδυασμοί γονοτύπων (*AAtt*, *AaTt*, *aaTT*) επικράτησαν

με συχνότητες 22.5%, 39.2% και 17.6% σε σύγκριση με τους λιγότερο συχνούς συνδυασμούς γονοτύπων *AATt*, *AATT* και *AaTT* (9.8%, 2.9% and 7.8%, αντίστοιχα).

Για τον υπολογισμό των συχνοτήτων των απλοτύπων συμπεριλήφθησαν μόνο τα άτομα, τα οποία ήταν ομόζυγα για τις θέσεις *ApaI* και *TaqI* ή ετερόζυγα για τη μία από τις δύο θέσεις, καθώς ο καθορισμός των ομόλογων χρωμοσωμάτων δεν ήταν εφικτός. Ένα ετερόζυγο άτομο για τους δύο γενετικούς τόπους (πχ ένα άτομο που έφερε το συνδυαστικό γονότυπο *Aa/Tt*, θα μπορούσε να φέρει τους απλότυπους *A/T* και *a/t* ή *a/T* και *A/t*. Έτσι επιλεκτικά τα παιδιά τα οποία έφεραν τους συνδυαστικούς γονότυπους *AAtt* (GGCC), *AATt* (GGTC), *AATT* (GGTT), *AaTT* (GTTT), και *aaTT* (TTTT) συμμετείχαν στη μελέτη των απλότυπων. Από τη σύγκριση των απλότυπων στις διάφορες ομάδες, το αλληλόμορφο *VDR ApaI a* μέρος του *VDR ApaI* και *TaqI* απλότυπου *aT* (σε σύγκριση με τους απλότυπους *At* και *AT*) ήταν πιο συχνό εύρημα σε παιδιά με παλιά λοίμωξη από εκείνα με χρονιότητα (47.4% vs. 27.3%; RR 1.74, 95% CI 0.97-3.13; p=0.049).

**Πίνακας IV.** Κατανομή των συχνοτήτων των γονοτύπων και απλοτύπων VDR σε 102 παιδιά που γεννήθηκαν από HBV θετικές μητέρες: 33 με χρόνια λοίμωξη, 36 με αυτόματη αποβολή του ιού και 33 υγιή παιδιά

Polymorphism	HWE <sup>a</sup>	Total	HBsAg	HBsAg	HBV
	<i>p</i> -value		persistence	clearance	naïvity
			(%)	(%)	(%)
<b><i>ApaI</i></b>					
Genotype					
<i>GG(AA)</i>	0.99	36 (35.3)	14 (42.4)	9 (25.0)	13 (39.4)
<i>GT(Aa)</i>	(0.80)	48 (47.1)	15 (45.5)	19 (52.8)	14 (42.4)
<i>TT(aa)</i>		18 (17.6)	4 (12.1)	8 (22.2)	6 (18.2)
Allele					
<i>G(A)</i>		120 (58.8)	43 (65.2)	37 (51.4)	40 (60.6)
<i>T(a)</i>		84 (41.2)	23 (34.8)	35 (48.6)	26 (39.4)
<b><i>TaqI</i></b>					
Genotype					
<i>TT(TT)</i>	0.86	29 (28.4)	8 (24.2)	11 (30.5)	10 (30.3)
<i>CT(Tt)</i>	(0.97)	50 (49.0)	16 (48.5)	19 (52.8)	15 (45.5)
<i>CC(tt)</i>		23 (22.5)	9 (27.3)	6 (16.7)	8 (24.2)
Allele					
<i>T(T)</i>		108 (52.9)	32 (48.5)	41 (56.9)	35 (53.0)
<i>C(t)</i>		96 (47.1)	34 (51.5)	31 (43.1)	31 (47.0)
<b>Joint haplotype</b>					
<i>TT(aT)</i>		44 (35.5)	12 (27.3)	18 (47.4)	14 (33.3)

<i>GT(AT)</i>	24 (19.3)	9 (20.4)	6 (15.8)	9 (21.4)
<i>GC(At)</i>	56 (45.2)	23 (52.3)	14 (36.8)	19 (45.2)
<i>TC(at)</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

---

<sup>a</sup> Hardy-Weinberg equilibrium; p values for patients (values for controls in parenthesis)

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η γνώση μας για τη μετάδοση του HBV από τη μητέρα στο βρέφος σταδιακά επεκτείνεται με πρόσφατες μελέτες συσχέτισης γονιδίων όπως τα HLA- DRB1\*07, *TNF-alpha 238A* και *interferon gamma (IFN- γ) 874A* με την ενδομήτρια μετάδοση [40], [60], ή μελέτες της T κυτταρικής απάντησης έναντι συγκεκριμένων ικών αντιγόνων [85], [86]. Καθώς οι μηχανισμοί της ανοσιακής ανοχής στον ιό της ηπατίτιδας Β στα παιδιά που μολύνονται περιγεννητικά ή στην πρώιμη βρεφική ηλικία δεν έχουν ακόμα πλήρως αποσαφηνιστεί, ο στόχος της μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης γενετικών ετερογένειας των γονιδίων *mb12*, *TNF-α*, και *VDR* στη μετάδοση της HBV λοίμωξης από θετικές μητέρες στα παιδιά τους και στην έκβαση της, δηλαδή την ιική κάθαρση ή την εξέλιξη σε χρόνια λοίμωξη.

Η Ελλάδα είναι χώρα χαμηλής ή μέτριας ενδημικότητας για τον HBV (φορεία HBsAg 0.29-2.6%) [87]. Η κάθετη μετάδοση από τη μητέρα στο παιδί σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα είναι σπάνια στις ευρωπαϊκές χώρες της Μεσογείου, καθώς τα νεογνά θετικών μητέρων λαμβάνουν άμεσα μετά την γέννηση παθητική και ενεργητική ανοσοπροφύλαξη και το ποσοστό των HBeAg θετικών μητέρων δεν είναι υψηλό. Η πλειοψηφία των χρόνιων HBV λοιμώξεων στην παιδική ηλικία μεταδίδονται οριζόντια, ενδοοικογενειακά και χαρακτηρίζονται από μικρότερη διάρκεια ανοσιακής ανοχής και ενεργούς νόσου σε σύγκριση με τα παιδιά της Νοτιοανατολικής Ασίας, τα οποία μολύνονται κυρίως περιγεννητικά και η HBeAg θετική φάση της χρόνιας νόσου τους είναι μεγαλύτερης διάρκειας [2]. Η μελέτη αυτή συμπεριέλαβε παιδιά νομαδικού πληθυσμού HBV θετικών μητέρων που είχαν γεννηθεί πριν την ευρεία εφαρμογή του προγράμματος ανοσοποίησης για τον HBV και έδειξαν χαμηλή συμμόρφωση στο μετέπειτα εμβολιασμό. Η διαφορετική κλινική έκβαση της λοίμωξης σε αυτά τα παιδιά μελετήθηκε σε σχέση με μεταλλαγές

γενετικών τόπων στα γονίδια των MBL, TNF-alpha και VDR και ανέδειξε σημαντικές συσχετίσεις μόνο με τις μεταλλαγές στα *TNF-alpha* και *VDR*.

Η MBL έχει σημαντικό ρόλο ως μόριο στην άμυνα πρώτης γραμμής σε άτομα χωρίς ακεραιότητα ανοσιακού συστήματος όπως στα βρέφη, στα άτομα με κυστική ίνωση, στα παιδιά μετά από χημειοθεραπεία ή μεταμόσχευση. Νέα δεδομένα αναδεικνύουν το σημαντικό της ρόλο και για κοινές λοιμώξεις της παιδικής ηλικίας όπως οξείες ή υποτροπιάζουσες λοιμώξεις του αναπνευστικού, η λοίμωξη από τον κυτταρομεγαλοϊό (CMV), τα εντοπιζόμενα αποστήματα και η οξεία μέση ωτίτιδα [88]. Η λειτουργική ανεπάρκεια του μορίου έχει συνδεθεί με τη συχνότητα, με τη σοβαρότητα και την έκβαση των λοιμώξεων στα παιδιά [29], [30], [31], [32]. Ο ρόλος της στην περιγεννητική μετάδοση ιογενών ηπατιτιδών παραμένει αμφιλεγόμενος, καθώς η προστατευτική της δράση δεν επιβεβαιώθηκε σε μελέτες ενηλίκων από την Ασία, οι περισσότεροι από τους οποίους είχαν μολυνθεί περιγεννητικά από τον HBV [89] και σε παιδιά με HCV λοίμωξη μετά από κάθετη μετάδοση [33].

Στο γονίδιο της MBL (*mb12*) έχουν αναγνωριστεί έξι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί, οι οποίοι επηρεάζουν τα επίπεδα ορού και τη στερεοταξία της λεκτίνης. Στο εξόνιο 1, οι μονοσημειακές αλλαγές στα κωδικόνια 52, 54 και 57, τα αλληλία *D*, *B* και *C* αντίστοιχα φαίνεται να επηρεάζουν την έκφραση της ή τη συγγένεια της βασικής δομικής μονάδας και κατά συνέπεια τα επίπεδα της λειτουργικής πρωτεΐνης. Τα μεταλλαγμένα αλληλία ομαδοποιούνται ως αλληλία *O* ενώ ως *A* αλληλία χαρακτηρίζεται ο γενετικός τύπος wild type. Τα αλληλία ανευρίσκονται με διαφορετική συχνότητα στους διάφορους πληθυσμούς. Έτσι το *B* αλληλία ανευρίσκεται στο 22-28% των πληθυσμών της Ευρώπης και της Ασίας, το *C* είναι σπάνιο στην Ευρώπη και ανευρίσκεται κυρίως σε υποσαχάριους αφρικανικούς



πληθυσμούς (συχνότητες 50-60%) και το *D* αλληλίο έχει συχνότητα 14% στις Ευρωπαϊκές χώρες. Επιπλέον πολυμορφισμοί που προδιαθέτουν σε μικρότερη έκφραση MBL έχουν αναγνωρισθεί στην περιοχή του υποκινητή του *mb12*, στις θέσεις -550H/L, -221X/Y, +4 P/Q [90]. Οι θέσεις αυτές βρίσκονται σε «ανισορροπία σύνδεσης» μεταξύ τους, καθώς και με τις κωδικοποιούσες γενετικές ποικιλίες του εξονίου. Έτσι μόνο επτά απλότυποι έχουν παρατηρηθεί *HYP A*, *LXPA*, *LYP A*, *HYPD*, *LYP B* και *LYQC*, σε διαφορετικές συχνότητες ανάμεσα στους διάφορους πληθυσμούς [90]. Η παρούσα μελέτη συμπεριέλαβε τα αλληλία *B* και *C* του εξονίου και τη θέση -221X/Y από τις γενετικές ποικιλίες του υποκινητή. Το αλληλίο *X* συνδέεται με τη μεγαλύτερη μείωση των επιπέδων MBL από τα υπόλοιπα του υποκινητή και συνδυάζεται μόνο με το *A* αλληλίο άγριου τύπου του εξονίου. Οι συχνότητες των αλληλομόρφων ήταν σε συμφωνία με εκείνες προηγούμενων αναφορών στον Καυκάσιο πληθυσμό [90]. Με βάση την «ανισορροπία σύνδεσης» τους που είχε περιγραφεί, προέκυψαν τέσσερις συνδυαστικοί γονότυποι: ο *A/A* υψηλής έκφρασης, ο *YA/O* ενδιάμεσης έκφρασης και οι *XA/O*, *O/O* χαμηλής έκφρασης [83].

Η μελέτη δεν ανέδειξε σημαντική διαφορά των γονοτύπων *mb12* σε παιδιά με διαφορετική κλινική έκβαση. Αρκετές προηγούμενες μελέτες έχουν αναγνωρίσει την ανεπάρκεια MBL ως παράγοντα κινδύνου για την μετάβαση της HBV λοίμωξης σε χρόνια στους ενήλικες και αντίθετα, τους γονότυπους υψηλής έκφρασης της λεκτίνης παράγοντες προστατευτικούς, προδιαθεσικούς για αυτόματη ιική αποβολή [91]. Οι Κουτσουνάκη και συνεργάτες έχουν επίσης δείξει στο παρελθόν τη σημασία των χαμηλών επιπέδων της λεκτίνης για την εξέλιξη της χρόνιας HCV λοίμωξης σε ενήλικο πληθυσμό Κρητών [78]. Αντίθετα έλλειψη συσχέτισης αναφέρθηκε σε προηγούμενη μελέτη σε Ασιάτες ενήλικες οι οποίοι είχαν μολυνθεί κυρίως με κάθετο τρόπο μετάδοσης [89] και σε μελέτη παιδιών με

κάθετη HCV λοίμωξη [33]. Τα ευρήματα μελετών συσχέτισης της ανεπάρκειας MBL στη λοίμωξη είναι συχνά μη συγκλίνοντα όπως πχ για τις λοιμώξεις του αναπνευστικού. Έγκυρη μελέτη των πολυμορφισμών της MBL και της συσχέτιση τους με τη συχνότητα αναπνευστικών λοιμώξεων μέσω ερωτηματολογίων δεν ανέδειξε σημαντικές διαφορές σε μεγάλο αριθμό παιδιών ηλικίας 1-4 ετών [83], σε αντίθεση με προηγούμενη καλά σχεδιασμένη μελέτη, στην οποία τα παιδιά με ανεπάρκεια MBL ήταν σε μεγαλύτερο κίνδυνο για αναπνευστική λοίμωξη από τα παιδιά με φυσιολογικές τιμές λεκτίνης [30]. Τα αντικρουόμενα ευρήματα μπορούν να αποδοθούν στο διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο των υπό μελέτη πληθυσμών, στις διαφορετικές μεθοδολογίες εκτίμησης της κλινικής νόσου ή στην ανάλυση διαφορετικών γενετικών τόπων ή απλοτύπων του γονιδίου.

Στη παρούσα μελέτη ανάλογη έλλειψη συσχέτισης με τους πολυμορφισμούς παρατηρήθηκε και για τα επίπεδα ορού. Είναι αρκετά δύσκολο να εκτιμηθούν τα λειτουργικά επίπεδα MBL σε σχέση με την ευπάθεια σε κάποια λοίμωξη για διάφορους λόγους. Αρχικά γιατί το όριο κάτω από το οποίο τα επίπεδα της MBL θεωρούνται ανεπαρκή δεν είναι σαφώς καθορισμένο. Κάποιες μελέτες χρησιμοποιούν τα 500ng/ml, άλλες τα 100ng/ml ή τα 1000ng/ml [92], [93], [94]. Εκτός από αυτήν την ασυμφωνία, η βιολογική δράση της MBL εξαρτάται και από αλλαγές στην ολιγομερή δομή της όπως προαναφέρθηκε, οι οποίες συνεπάγονται μείωση της συγγένειας σύνδεσης της λεκτίνης και οδηγούν σε ελαττωματικό φαινότυπο. Τέλος η MBL είναι πρωτεΐνη οξείας φάσης και η συγκέντρωσή της αυξάνεται κατά 1.5-3 φορές ως απάντηση σε stress [95]. Έτσι τα μετρούμενα επίπεδα στη λοίμωξη εξαρτώνται από τα επίπεδα της λεκτίνης το χρονικό διάστημα πριν τη λοίμωξη, που στη μελέτη αυτή όπως και σε προηγούμενες δεν ήταν γνωστά.

Η επιλογή του TNF-alpha ως υποψήφιου γενετικού δείκτη έγινε εξαιτίας της γνωστής ανοσοτροποποιητικής δράσης της κυτταροκίνης και της συσχέτισης της με την παθογένεια ενός μεγάλου αριθμού αυτοάνοσων και λοιμωδών ασθενειών στον άνθρωπο. Ο TNF-alpha είναι γνωστός κυρίως για την προφλεγμονώδη δράση του. Ωστόσο μελέτες γονιδιακά ελεγχόμενων ποντικών έδειξαν ότι ο TNF-alpha έχει διπλό ρόλο, λειτουργεί ως προφλεγμονώδης κυτταροκίνη στα αρχικά στάδια της λοίμωξης και ως κατασταλτική κυτταροκίνη ή ανοσορυθμιστικός παράγοντας στα επόμενα στάδια της ανοσιακής απάντησης [96]. Μία διαφοροποίηση στο σύστημα ρύθμισης του TNF-alpha μπορεί επίσης να επιφέρει αλλαγή της δράσης του παράγοντα [55].

Ο πολυμορφισμός TNF-alpha -308G/A φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση της κυτταροκίνης. Η μεταλλαγή οδηγεί σε δύο διαφορετικές μορφές του ίδιου γενετικού τόπου: η γουανίνη χαρακτηρίζει το κοινό αλληλίο TNFA\*1 και ο αντικαταστάτης της η αδενοσίνη το σπανιότερο αλληλίο TNFA\*2. Η παρουσία του σπανιότερου TNFA\*2 έχει συνδεθεί με αυξημένη αυτόματη ή μετά από διέγερση παραγωγή του TNF-alpha in vitro και in vivo [97]. Οι μετέπειτα μελέτες της επίδρασης του πολυμορφισμού στη μεταγραφή του παράγοντα έχουν αποδώσει αντικρουόμενα αποτελέσματα, πιθανά λόγω του διαφορετικού μήκους της αλληλουχίας του υποκινητή που μελετήθηκε, του διαφορετικού τύπου των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν, της ανθρώπινης ή όχι προέλευσης τους κτλ. Σήμερα αμφισβητείται ότι τα επίπεδα ορού του TNF-alpha αντιστοιχούν με τα αλληλίου του πολυμορφισμού -308, αλλά δε μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα ο τελευταίος να επηρεάζει την τοπική συγκέντρωση του παράγοντα [55]. Τέλος η ρύθμιση της δράσης του TNF-alpha γίνεται εκτός από τον καθορισμό των επιπέδων του, με την πιθανή επίδραση

του πολυμορφισμού στη σύνδεση των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων ή στην παραγωγή και απελευθέρωση της πρωτεΐνης [55].

Στο παρελθόν ο -308 πολυμορφισμός του υποκινητή έχει συνδεθεί με τον κίνδυνο ανάπτυξης νευρολογικών επιπλοκών στην ελονοσία, με την έκβαση της λειψμανίας και της σήψης που επιπλέκει το τραύμα. Οι μελέτες αφορούν κυρίως ενήλικο πληθυσμό. Πρόσφατη μελέτη συσχέτισης του -308 με τον κίνδυνο νεογνών πολύ χαμηλού βάρους γέννησης να αναπτύξουν σήψη δεν ανέδειξε συσχέτιση, υποδεικνύοντας διαφορετικό μηχανισμό ρύθμισης του TNF-alpha μεταξύ ενηλίκων και βρεφών [98].

Στην παρούσα μελέτη ανιχνεύτηκαν τα αλληλία στη θέση -308 με συχνότητα ανάλογη με εκείνη πληθυσμών της νότιας Αφρικής (5%), μικρότερη από εκείνη προηγούμενης αναφοράς σε Καυκάσιο πληθυσμό της Μεγάλης Βρετανίας (30%) [99]. Το αλληλόμορφο TNF-alpha -308 G βρέθηκε να έχει αυξημένη συχνότητα σε χρόνιους HBV ασθενείς σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου καθώς και σε παιδιά που μολύνθηκαν σε σύγκριση με εκείνα που δε μολύνθηκαν παρά την έκθεση στον ιό. Ευρήματα προηγούμενων μελετών σε ενήλικες βρίσκονται σε συμφωνία με αυτό το αποτέλεσμα: το *TNF-alpha -308G* έχει συνδεθεί με μεγαλύτερο κίνδυνο ιικής επιμονής [57], [58] ή εξέλιξη της ηπατικής νόσου [56], ενώ το -308A αλληλόμορφο με καλλίτερη πρόγνωση της HBV λοίμωξης [54]. Η υπόθεση της μεγαλύτερης έκφρασης του παράγοντα παρουσία του -308A αλληλομόρφου παρέχει εξήγηση για τις παραπάνω συσχετίσεις, βρίσκεται ωστόσο σε αντίθεση με το εύρημα ότι σε παιδιά με χρόνια HBV λοίμωξη σε φάση ανοσιακής ανοχής, η παραγωγή του TNF-alpha από μονοκύτταρα περιφερικού αίματος μετά τη διέγερση τους ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με υγιή άτομα ελέγχου [100]. Η αντιφατικότητα αυτή αίρεται αν ο πολυμορφισμός -308 δεν επηρεάζει τα επίπεδα του ορού αλλά επιδρά στην έκφραση του

παράγοντα στον τόπο της φλεγμονής όπως προτάθηκε στην ανασκόπηση των Elahi et al [55]. Τέλος η συσχέτιση της έκβασης της HBV λοίμωξης με τον -308 μπορεί να ερμηνευτεί με τη σύνδεση του γενετικού τόπου με τα γειτονικά γονίδια της περιοχής HLA (HLADR13), τα οποία επίσης συσχετίζονται με έντονη ανοσιακή απόκριση έναντι του HBV [54].

Τα τελευταία χρόνια η βιταμίνη D έχει έρθει στο προσκήνιο της έρευνας καθώς έχει βρεθεί ότι έχει πολλαπλές δράσεις εκτός από τη ρύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου και του μεταβολισμού των οστών. Η βιταμίνη είναι μία ορμόνη με δομή στεροειδούς στην ενεργό της μορφή (καλσιτριόλη, 1,25(OH)<sub>2</sub>D) και ασκεί τη δράση της μέσω του υποδοχέα της VDR, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων των πυρηνικών ορμονών και έχει ρόλο μεταγραφικού παράγοντα [101]. VDR υποδοχείς ανευρίσκονται σε πολλούς τύπους κυττάρων, όπως σε κύτταρα του θύμου αδένα, στα μακροφάγα και σε T και B κύτταρα του μυελού των οστών. Το σύστημα ρύθμισης της βιταμίνης είναι δυναμικό και περιλαμβάνει πολλούς παράγοντες, ο καθένας από τους οποίους έχει συσχετιστεί με την έκβαση της νόσου. Εκτός από τη ρύθμιση της βιταμίνης D μέσω του υποδοχέα της VDR, η με την βιταμίνη D συνδεόμενη πρωτεΐνη (vitamin D binding protein), τα ένζυμα υδροξυλίωσης CYP2R1 και CYP27B1 των μη ενεργών μορφών της βιταμίνης και άλλα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 [102] επηρεάζουν τη λειτουργία της. Εκτός από την πολυπλοκότητα του συστήματος βρέθηκε ότι τα επίπεδα ορού 1,25 OHD δεν εκφράζουν την αυτοκρινή ή την παρακρινή δράση της ενεργούς ορμόνης και επικρατεί μεγάλη ετερογένεια σχετικά με τα επίπεδα της βιταμίνης που προδιαθέτουν σε φτωχή πρόγνωση στην ασθένεια [102], αποδυναμώνοντας το διαχωρισμό των επιπέδων της βιταμίνης D σε επαρκή, μετρίου βαθμού ανεπαρκή (insufficiency) και σοβαρού βαθμού ανεπαρκή (deficiency).

Ο ρόλος της βιταμίνης D στην ευπάθεια στις λοιμώξεις είναι αδιαμφισβήτητος. Η ανεπάρκεια της βιταμίνης έχει συσχετιστεί με την ευπάθεια και τη σοβαρότητα της φυματίωσης [103] με τη συχνότητα και τη διάρκεια νοσηλείας για λοιμώξεις ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού [63], με τον αριθμό των CD4 κυττάρων HIV θετικών ατόμων [104]. Οι συσχετίσεις αυτές εξηγούνται αν ληφθεί υπόψη ο ρόλος της βιταμίνης στην εγγενή και προσαρμοστική ανοσία: Η βιταμίνη ενεργοποιείται μέσω του μονοπατιού των TLRs και προάγει την εγγενή ανοσιακή απάντηση μέσω της διέγερσης της αντιγονοεπεξεργασίας, φαγοκυττάρωσης, παραγωγής IL-1β και TNF-alpha [105]. Αντίθετα περιορίζει την υπερβολική αντίδραση της προσαρμοστικής ανοσίας, επιδρώντας τόσο στα κύτταρα της τελευταίας αλλά και στην ικανότητα της εγγενούς ανοσίας να διεγείρει την επίκτητη, μέσω της καταστολής της IL12 και της διαφοροποίησης των δενδριτικών κυττάρων [63].

Από τους γειτονικούς πολυμορφισμούς που έχουν εντοπιστεί στο γονίδιο του VDR (εικόνα IV) τέσσερις είναι πιο συχνοί στις μελέτες συσχέτισης, οι *FokI*, *BsmI*, *ApaI* και *TaqI*. Ο *FokI* επηρεάζει άμεσα τη συγκέντρωση 25OH D: το λιγότερο συχνό αλληλίο *T* συσχετίστηκε με υψηλή συγκέντρωση βιταμίνης. Ο πολυμορφισμός προκαλεί αλλαγές στην θέση έναρξης μεταγραφής του VDR, προκαλεί την παραγωγή μικρότερου μεγέθους πρωτεΐνης και αλλάζει τις λειτουργικές ιδιότητες του υποδοχέα. Η διαφορετική λειτουργικότητα του υποδοχέα μπορεί να μεταβάλλει την ενεργοποίηση γονιδίων από τη βιταμίνη και να έχει επίδραση σε ένα μεγάλο εύρος ενζύμων που εμπλέκονται στην παραγωγή και στην απομάκρυνση της 25OH D [102]. Εκτός από τον *FokI*, οι υπόλοιποι πολυμορφισμοί στο 3' άκρο του γονιδίου φαίνεται να είναι μη λειτουργικοί και σε «ανισορροπία σύνδεσης» μεταξύ τους. Η συσχέτιση τους με τη ευπάθεια στη νόσο

υποθετικά αποδίδεται στην σύνδεση τους με ένα ή περισσότερους λειτουργικούς πολυμορφισμούς σε κάποια άλλο σημείο εντός ή εκτός του γονιδίου [64].

Οι Janssen et al. παρατήρησαν σημαντική συσχέτιση της γενετικής ευπάθειας στη βρογχολίτιδα από RSV με διάφορους πολυμορφισμούς γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων του VDR [106]. Οι Roth et al έδειξαν ότι τα παιδιά με γονότυπο *ff* (*FokI*) είναι σε αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν λοίμωξη κατώτερου αναπνευστικού (κυρίως RSV βρογχολίτιδα) [107], ενώ οι Aslan et al βρήκαν το *FokI* (*ff* γονότυπο) επιβαρυντικό και τον *ApaI* (*a* αλληλίο) προστατευτικό παράγοντα για την ουρολοίμωξη [108]. Οι πολυμορφισμοί έχουν επίσης συσχετιστεί με την ευπάθεια στον HIV-1 [109]. Σχετικά με τις ιογενείς ηπατίτιδες, η άμεση αντική δράση της βιταμίνης D σε κυτταρικές σειρές έχει αναδειχτεί για τον HCV [110], [111] και οι πολυμορφισμοί του VDR (non *bat*-CCA απλότυπος και non CC-*ApaI* genotype) έχουν συσχετιστεί με παρατεταμένη ιική απάντηση στη θεραπεία, ενώ η ανεπάρκεια της βιταμίνης έχει αναγνωριστεί ως προγνωστικό στοιχείο αποτυχίας της θεραπείας [112]. Οι πολυμορφισμοί VDR (*bAt*-CCA και *ApaI* CC) φάνηκαν επίσης να προδιαθέτουν σε εξέλιξη της ίνωσης στη χρόνια νόσο [113]. Η βιταμίνη D στην πρώιμη HBV λοίμωξη μπορεί να επηρεάζει την πυροδότηση της εγγενούς ανοσίας, να καταστέλλει την έκφραση των IL-12 και IFN-  $\gamma$  και τη διαφοροποίηση των δενδριτικών κυττάρων [63], [114]. Σε πρόσφατη μελέτη από την Κίνα HBV θετικών ατόμων με διαφορετική κλινική έκβαση και υγιών ατόμων ελέγχου, οι γονότυποι του πολυμορφισμού *TaqI* βρέθηκαν να έχουν παρόμοιες συχνότητες ανάμεσα στις ομάδες σύγκρισης [115], εύρημα που είναι αντιφατικό με τον προστατευτικό ρόλο του γονότυπου *tt* της θέσης *TaqI* προηγούμενης μελέτης σε παιδιά και ενήλικες με ηπατίτιδα B [116].

Στη μελέτη το αλληλόμορφο *VDR ApaI a* φαίνεται να συσχετίζεται με την κάθαρση της λοίμωξης από HBV και οι απλότυποι *aT*, *At* (*ApaI* - *TaqI*), οι οποίοι είναι οι πιο κοινοί στην Καυκάσια φυλή [64], [117] συσχετίστηκαν με ικκή κάθαρση και ικκή επιμονή αντίστοιχα. Σε μία μελέτη από την Ινδία ο γονότυπος *ApaI aa* και ο απλότυπος *at* συσχετίστηκαν με σοβαρή ηπατική βλάβη και υψηλότερο ιικό φορτίο [67], ενώ σε ενήλικες από το Ταϊβάν ο απλότυπος *At* συσχετίστηκε με συχνές αναζωπυρώσεις της ηπατικής φλεγμονής και εμμένουσα θετικοποίηση του HBeAg [118]. Αν και ο γονότυπος *TT* έχει συσχετιστεί με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης *VDR* και μεγαλύτερη ικανότητα των κυττάρων του ξενιστή να χρησιμοποιούν τη βιταμίνη D [119], η επίδραση των ποικιλιών *VDR ApaI* και *TaqI* στις ανοσιακές λειτουργίες της βιταμίνης είναι άγνωστη και οι αντιφατικές συχνά συσχετίσεις των *VDR ApaI* και *TaqI* στους υπό μελέτη πληθυσμούς μπορεί να εξηγηθεί μέσω της έλλειψης της λειτουργικότητας τους ή της σύνδεσης τους με άλλους άγνωστους λειτουργικούς πολυμορφισμούς, πιθανά διαφορετικούς ανάμεσα στις διάφορες φυλές [64].

Βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση του φύλου με τη μόλυνση από τον HBV στην πρώιμη παιδική ηλικία, καθώς τα θήλεα άτομα είχαν μεγαλύτερο κίνδυνο να αποκτήσουν λοίμωξη από τα άρρενα άτομα ( $p=0.032$ ; RR=1.33, CI 1.00-1.74). Κανένα φύλο ωστόσο δεν υπερείχε στην αυτόματη αποβολή του ιού ή στην μετάβαση σε χρόνια νόσο. Προηγούμενες μελέτες από την Ελλάδα και το εξωτερικό είχαν αναδείξει μεγαλύτερη επικράτηση του άρρενος φύλου μεταξύ των θετικών για το HBsAg ατόμων [120], [121]. Επίσης μελέτη ατόμων με ηπατίτιδα Β που χρειάστηκαν ηπατική μεταμόσχευση επιβεβαίωσε ότι τα θήλεα άτομα ενέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν οξεία ηπατική ανεπάρκεια κατά τη διάρκεια της οξείας νόσου, ενώ τα άρρενα άτομα να



αναπτύξουν χρόνια ηπατίτιδα που καταλήγει σε τελικού σταδίου ηπατική νόσο [122]. Ωστόσο πρόσφατη μελέτη μεγάλου πληθυσμού στην Ταϊβάν έδειξε ότι η επιρροή του φύλου εξαρτώνταν από το χρόνο και τον τρόπο μετάδοσης του ιού. Έτσι όταν η λοίμωξη συνέβαινε στην παιδική ηλικία, οπότε τα επίπεδα των ορμονών του φύλου ήταν ακόμα χαμηλά, η επικράτηση του αρρενος φύλου εξαλείφεται και άλλοι παράγοντες όπως το μητρικό φορτίο καθορίζουν τη μετάδοση [123]. Αντίθετα, έχει επιβεβαιωθεί η αυξημένη ευπάθεια των θηλέων νεογνών στην ενδομήτρια και περιγεννητική μετάδοση της λοίμωξης από τον HIV από τους Biggar et al, αποδιδόμενη στην έλλειψη των αντιδράσεων ιστοσυμβατότητας μεταξύ των μητρικών λεμφοκυττάρων και των εμβρυικών αντιγόνων εντοπιζόμενων στο Y χρωμόσωμα [124]. Συμπερασματικά, η συσχέτιση της μετάδοσης του ιού με το θηλυκό φύλο στην παρούσα μελέτη θα μπορούσε να αποδοθεί σε ανάλογη έλλειψη ή τροποποίηση της ανοσολογικής αντίδρασης της μητέρας προς το παιδί κατά τις μικρομεταγίσεις στην περιγεννητική περίοδο, η οποία με κάποιο μηχανισμό διευκολύνει την εισβολή των ιικών αντιγόνων και την επέκτασή τους στο έμβρυο. Μία τέτοια υπόθεση ωστόσο χρειάζεται επιβεβαίωση σε επαρκή αριθμό νεογνών HBV θετικών μητέρων.

### **Περιορισμοί της μελέτης**

Διάφοροι περιορισμοί θα πρέπει να ληφθούν υπόψη στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της μελέτης αυτής. Η αναδρομική φύση και ο σχεδιασμός της δεν επιτρέπουν τη γνώση πληροφοριών όπως η ακριβής χρονική στιγμή της έκθεσης του βρέφους στον ιό της μητέρας, το μητρικό ιικό φορτίο και η ορολογική κατάσταση της μητέρας στην κύηση ή τον τοκετό, παράγοντες που είναι γνωστό ότι σχετίζονται με διαφορετική έκβαση τη λοίμωξης του βρέφους. Ωστόσο όλα τα παιδιά της μελέτης είχαν γεννηθεί από HBV θετικές μητέρες, είχαν εκτεθεί στον HBV περίπου έως τα 2 έτη και διέτρεχαν παρόμοιο

κίνδυνο λοίμωξης ή ανάπτυξης χρόνιας λοίμωξης [125]. Η διαπίστωση της λοίμωξης της μητέρας βασίστηκε στα πρόσφατα ορολογικά της αποτελέσματα και στην προσωπική της μαρτυρία σχετικά με την ορολογική της κατάσταση στον τοκετό. Εντούτοις δεν ήταν εφικτή η διαστρωμάτωση των παιδιών σε εκείνα που είχαν γεννηθεί από HBeAg θετικές και HBeAb θετικές μητέρες, η οποία ενδεχομένως διαφοροποιούσε τις συσχετίσεις με την έκβαση της λοίμωξης [2]. Επίσης δεν ήταν γνωστή η αιτία της φτωχής συμμόρφωσης με την έγκαιρη ανοσοπροφύλαξη σε αυτά τα παιδιά. Πιθανολογούνται λόγοι όπως η γέννηση των παιδιών πριν την ευρεία εφαρμογή του προγράμματος ανοσοποίησης, το χαμηλό μορφωτικό επίπεδο των γονέων, η δύσκολη πρόσβαση σε υπηρεσίες υγείας και η έλλειψη ασφαλιστικής κάλυψης. Τα παιδιά άνηκαν σε νομαδικό πληθυσμό με συγχρωτισμό των ατόμων στις κατοικίες και αυξημένα ποσοστά φορέας του HBV. Έτσι η οριζόντια, ενδοοικογενειακή μετάδοση δεν ήταν δυνατό να αποκλειστεί, καθώς δεν ήταν γνωστή η ορολογική κατάσταση όλων των υπολοίπων μελών της οικογένειας.

Εκτός από την έλλειψη πληροφοριών, το μικρό μέγεθος τους δείγματος αποτέλεσε επιπλέον περιορισμό, λόγω της συσχέτισης του με αυξημένη πιθανότητα ανεύρεσης στατιστικού λάθους τύπου II και παραβίασης της ισορροπίας Hardy-Weinberg στην κατανομή των αλληλομόρφων. Για τη συλλογή επαρκούς αριθμού παιδιών έγινε δειγματοληψία και έλεγχος ενός μεγάλου αριθμού ατόμων, αλλά η ανεύρεση μεγαλύτερων ομάδων παιδιών με πρόωμη HBV λοίμωξη σε μία μη ενδημική χώρα όπως η Ελλάδα είναι δύσκολη. Στις μέρες μας τα νεογνά που γεννιούνται από HBsAg θετικές μητέρες λαμβάνουν ανοσοσφαιρίνη και εμβολιάζονται άμεσα στη γέννηση. Έτσι οι περιπτώσεις HBV λοίμωξης στην παιδική ηλικία αφορούν σε αποτυχία της ανοσοποίησης, οι οποίες δε θα μπορούσαν να ομαδοποιηθούν για τη μελέτη ανοσολογικών παραγόντων με παιδιά που

δεν έχουν εκτεθεί σε τεχνητή ανοσοποίηση. Τέλος μεθοδολογικό περιορισμό αποτέλεσε η παραβίαση της ισορροπίας Hardy- Weinberg για τον *TNF-α* πολυμορφισμό. Το φαινόμενο θα μπορούσε να αποδοθεί στο μικρό μέγεθος του δείγματος και στην κλειστή γονιδιακή δεξαμενή λόγω των υψηλών ποσοστών συγγένειας αίματος μεταξύ των συντρόφων. Η παραβίαση της ισορροπίας έχει παρατηρηθεί σε προηγούμενες μελέτες και έχει αποδοθεί σε ύπαρξη συσχέτισης του γενετικού τύπου με τη νόσο, σε μη-τυχαίο ζευγάρισμα και σε κοινό γενετικό υπόβαθρο των υπό μελέτη πληθυσμών [79].

## 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη μελέτη αυτή έγινε προσπάθεια να εξάγουμε συμπεράσματα για την ενδεχόμενη γενετική προδιάθεση των παιδιών στη μόλυνση από τον HBV της μητέρας τους ή να στην ανάπτυξη χρόνιας HBV λοίμωξης από τη σύγκριση συχνοτήτων αλληλομόρφων και γονοτύπων γενετικών τόπων σε καίριους ανοσιακούς παράγοντες. Συμπεριλάβαμε έξι γενετικούς τόπους, που είχαν προηγουμένα μελετηθεί σε σχέση με την ηπατίτιδα Β σε ενήλικο πληθυσμό, αλλά δεν είχαν μελετηθεί σε σχέση με την HBV λοίμωξη στην πρώιμη παιδική ηλικία. Τα ευρήματα μας υποδεικνύουν ότι το μονοπάτι του TNF-alpha και πιθανά της vitamin D μπορεί να εμπλέκονται στην εξέλιξη της πρώιμης HBV λοίμωξης. Ωστόσο δε μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα και τα ευρήματα μας πρέπει να θεωρηθούν προκαταρκτικά μέχρι την επιβεβαίωση τους από γονοτυπικές και φαινοτυπικές μελέτες σε μεγαλύτερους και διαφορετικούς πληθυσμούς. Παρά την πρόοδο που έχει σημειωθεί πάνω στην κατανόηση της πρώιμης HBV λοίμωξης τα τελευταία έτη, μένουν πολλά ακόμα να διερευνηθούν στο πεδίο της ανοσιακής απάντησης του ξενιστή σε αυτήν την κρίσιμη περίοδο της ζωής.

Γενετικές μελέτες συσχέτισης με τις συγκεκριμένες μεταλλαγές είχαν πραγματοποιηθεί σε άλλες παιδιατρικές παθήσεις στο παρελθόν, αλλά συχνά απέδιδαν μη συγκλίνοντα αποτελέσματα λόγω των διαφορετικών ρυθμιστικών μηχανισμών στις διάφορες ηλικιακές ομάδες, των μεγεθών των υπό μελέτη πληθυσμών ή υπαρχόντων συνδέσεων των γονιδίων στόχων που είχαν συνέπεια ένας συγκεκριμένος συνδυασμός αλληλομόρφων να εμφανίζεται πιο συχνά από το τυχαίο αναμενόμενο. Στις μέρες μας είναι διαθέσιμες μελέτες συσχέτισης με σάρωση όλου του εύρους του γονιδιώματος (Genome Wide Association Studies), οι οποίες αποτελούν ισχυρές μεθόδους για την αναγνώριση γονιδίων

που εμπλέκονται στον καθορισμό του φαινοτύπου της νόσου [23]. Χαρακτηριστικά στην HCV λοίμωξη μέσω GWAS αναδείχθηκαν καινούριες ποικιλίες της κωδικοποιούσας περιοχής του γονιδίου (IL28B) της ιντερφερόνης λάμδα ως οι πιο καθοριστικές περιοχές σε όλο το γονιδίωμα για την αυτόματη και επαγόμενη με θεραπεία αποβολή του HCV, προσφέροντας ένα ελπιδοφόρο μέσο για την αντιμετώπιση της ιογενούς ηπατίτιδας [126], [127].

Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός μίας γενετικής συσχέτισης είναι απαραίτητος για την ερμηνεία της παρουσίας ή της απουσίας της συσχέτισης. Στην παρούσα μελέτη ανιχνεύτηκαν οι πολυμορφισμοί και παράλληλα προσδιορίστηκαν τα επίπεδα ορού της MBL, αναδεικνύοντας ότι τα χαμηλά επίπεδα ορού ταυτίζονται με την παρουσία αλληλομόρφων χαμηλής έκφρασης, σε συμφωνία με προηγούμενα βιβλιογραφικά δεδομένα. Οι συχνότητες των αλληλομόρφων και των επιπέδων ορού της λεκτίνης βρέθηκαν να έχουν παρόμοια κατανομή μεταξύ των τριών ορολογικών ομάδων. Αντίθετα για τους πολυμορφισμούς *TNF-α* και *VDR*, η λειτουργικότητα δεν είναι πλήρως καθορισμένη. Η συνδυαστική αναγνώριση των γενετικών δεικτών και ο λειτουργικός χαρακτηρισμός τους, μειώνει τον κίνδυνο μεθοδολογικών ασυμφωνιών και είναι απαραίτητα ώστε να βεβαιωθεί η συμβολή της γενετικής ετερογένειας στον καθορισμό της γονιδιακής έκφρασης και του γενετικού προϊόντος στην παθογένεια της νόσου. Συνεπώς στόχος της μελλοντικής έρευνας είναι να αξιοποιήσει όλες τις υπάρχουσες προκαταρτικές συσχέτισεις και να αποσαφηνίσει τους μηχανισμούς που τις εξηγούν σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο.

Μετά την καθιέρωση του προγράμματος ανοσοποίησης για τον HBV παγκοσμίως, η περιγεννητική αλλά και η οριζόντια μετάδοση στην παιδική ηλικία έχει σημαντικά

περιοριστεί. Η λοίμωξη σήμερα έχει συνδυαστεί με περιπτώσεις αποτυχίας της ανοσοπροφύλαξης. Το πρόβλημα έγκειται στη νεογνική και βρεφική ηλικία, καθώς σύμφωνα με τους Ni et al η χρόνια λοίμωξη εγκαθίσταται πριν την ηλικία των 2 ετών [125]. Τα κλινικά δεδομένα για αυτές τις περιπτώσεις αναδεικνύουν τα υψηλά επίπεδα ιαμίας (παρουσία HbeAg) της μητέρας, την ενδομήτρια λοίμωξη και την μόλυνση από ιικά στελέχη που μπορούν να διαφεύγουν από την πίεση του ανοσολογικού συστήματος ως παράγοντες κινδύνου. Σχετικά με τη γενετική προδιάθεση το ενδιαφέρον στρέφεται σε γονίδια του HLA, όπως σε πρόσφατη GWAS τα αλληλόμορφα HLA-DP αναγνωρίστηκαν ως γενετικοί τόποι ευπάθειας για χρόνια ηπατίτιδα Β [128].

Η μελέτη μας ήταν αναδρομική σε πληθυσμό με χαμηλή συμμόρφωση με το εθνικό σύστημα εμβολιασμού. Μειονεκτεί στο ότι δεν είναι γνωστή η ακριβής χρονική στιγμή μόλυνσης των παιδιών, το μητρικό ιικό φορτίο πριν και μετά τη γέννηση ή τα ορολογικά στοιχεία όλων των υπολοίπων μελών της οικογένειας. Έτσι βασίζουμε την υπόθεση της μετάδοσης του ιού από τη μητέρα στο παιδί μόνο στα θετικά ορολογικά αποτελέσματα της μητέρας, χωρίς να είναι δυνατός ο αποκλεισμός της μετάδοσης από άλλο μέλος της οικογένειας όπως ο πατέρας ή της ενδοοικογενειακής μετάδοσης. Ωστόσο σε όλα τα παιδιά η έκθεση στον ιό είχε συμβεί περίπου έως τα πρώτα 2 έτη της ζωής και διέτρεχαν παρόμοιο κίνδυνο λοίμωξης ή χρόνια νόσου. Είχαν την ιδιαιτερότητα ότι δεν είχαν λάβει καθόλου ή πλήρη ανοσοποίηση και δεν είχαν εκτεθεί σε αντική αγωγή, επομένως συνιστούσαν ένα πληθυσμό ανεπηρέαστο από τεχνητές ανοσολογικές πιέσεις. Η ανεύρεση μεγαλύτερου δείγματος και η διενέργεια ανάλογης προοπτικής μελέτης είναι δύσκολη σε αυτή την ηλικία, καθώς όλα τα νεογνά θετικών μητέρων στην Ελλάδα λαμβάνουν άμεσα παθητική και ενεργητική ανοσοπροφύλαξη στη γέννηση.

Τα ευρήματα μας υποδεικνύουν τη συμμετοχή της θέσης -308 του *TNF-alpha* και των πολυμορφισμών *ApaI* και *TaqI* του *VDR* στη γενετική ευπάθεια των παιδιών με HBV λοίμωξη. Ο ρόλος του TNF-alpha στην HBV λοίμωξη φαίνεται να είναι διαφορετικός σε ενήλικες και βρέφη, ενώ η γνωστή αντική του δράση είναι αντιφατική με τη ιδιότητα του να ευνοεί την ανοσολογική ανοχή. Οι πολυμορφισμοί του *VDR* φαίνεται επίσης να επηρεάζουν τη λειτουργικότητα του υποδοχέα και επομένως τη δράση της βιταμίνης D μέσω της σύνδεσης τους με άγνωστο λειτουργικό γενετικό τόπο εντός ή εκτός του γονιδίου του *VDR*. Συνεπώς δεν είναι γνωστό αν η συσχέτιση τους αντανακλά λειτουργική ανεπάρκεια της βιταμίνης D σε ένα πληθυσμό της Μεσογείου με μεγάλη έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία ή υποδεικνύει συσχέτιση με άλλον γενετικό τόπο, καίριο για τον έλεγχο του HBV. Τα ερωτήματα αυτά θα μπορούσαν να απαντηθούν με μελλοντικές μελέτες σάρωσης όλου του γονιδιώματος, σε δείγματα ολικού αίματος ή βιοψιών ήπατος βρεφών με γνωστή περιγεννητική λοίμωξη και προοπτική παρακολούθηση των κλινικοεργαστηριακών τους δεδομένων.

Τα ευρήματα μας μαζί με τα αποτελέσματα άλλων μελετών συσχέτισης, ενδεχομένως να συνεισφέρουν στη διευκρίνιση της ανοσογενετικής του HBV. Μπορούν να αναδείξουν γενετικούς δείκτες για την αναγνώριση ατόμων, τα οποία διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να έχουν φτωχή έκβαση και που χρήζουν συστηματικής παρακολούθησης. Μελλοντικά ενδέχεται να γίνει εφικτή η θεραπευτική παρέμβαση στα ανεπαρκή γονιδιακά προϊόντα που εμπλέκονται στον έλεγχο του HBV και στην απάντηση των εμβολιασμό. Χαρακτηριστικά για τη βιταμίνη D, γίνεται συζήτηση για την ανάπτυξη εξατομικευμένων συστάσεων για τα άτομα με γονότυπους που προδιαθέτουν σε ανεπάρκεια της βιταμίνης, ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος ανεπιθύμητης έκβασης της νόσου (nutrigenomics) [102]. Τέλος μελλοντική

προοπτική αποτελεί και η ανάπτυξη εξατομικευμένων εμβολίων και δοσολογίας τους με βάση την παρατήρηση του γονότυπου και του φαινοτύπου. Η τεράστια διαθεσιμότητα μονογονιδιακών πολυμορφισμών, οι πρόσφατες εξελίξεις της βιοπληροφορικής, η τεχνολογία μικροσυστοιχιών και η κατά τόπους μεταλλαξιγένεση θα αποτελέσουν αρωγό σε μελλοντικές μελέτες και αφήνουν ελπίδες για την ανάπτυξη αυτοματοποιημένων, γρήγορων και προσιτών εργαλείων στη διαγνωστική και στη θεραπευτική της ηπατίτιδας B.



### **Ερευνητικοί ορίζοντες στην κάθετη μετάδοση του HBV**

Σε μία επόμενη μελέτη της μετάδοσης του HBV από τη μητέρα στο παιδί διάφορες παράμετροι πρέπει να ληφθούν υπόψη: Για τη συγκέντρωση ικανοποιητικού αριθμού παιδιών στην Ελλάδα και την εξασφάλιση της στατιστικής δύναμης της μελέτης, απαιτείται πολυκεντρική συμμετοχή λόγω του εξαιρετικά μικρού ποσοστού βρεφών που αποκτούν περιγεννητική λοίμωξη στη χώρα μας [129]. Η φύση της μελέτης θα ήταν προτιμότερο να είναι προοπτική από τη γέννηση, ώστε να είναι εφικτή η εκτίμηση των παιδιών στα μετέπειτα χρόνια και η συσχέτιση των ανοσολογικών παραγόντων με την έκβαση (ηλικία HBeAg ορομετατροπής ή πλήρους ίασης), εκτός από τον κίνδυνο μετάδοσης του HBV. Ο σχεδιασμός της μελέτης είναι καθοριστικός για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων: η ομάδα των νεογνών HBsAg θετικών μητέρων με περιγεννητική λοίμωξη θα πρέπει να συγκριθεί με ανάλογο αριθμό νεογνών HBsAg θετικών μητέρων χωρίς περιγεννητική λοίμωξη, ανάλογης ηλικίας κύησης, που έχουν εκτεθεί σε ταυτόσημο πρόγραμμα παθητικής και ενεργητικής ανοσοπροφύλαξης από τη γέννηση. Η δειγματοληψία των βρεφών θα μπορούσε να γίνει στη γέννηση (ομφαλικό αίμα θα μπορούσε επίσης να αξιοποιηθεί) και σε ηλικία 18-24 μηνών, μαζί με το προγραμματισμένο ορολογικό έλεγχο του αποτελέσματος της ανοσοποίησης αυτών των παιδιών και όταν τα μητρικά αντισώματα θα έχουν πλέον εξαλειφθεί από την κυκλοφορία του βρέφους. Παράγοντες όπως η ορολογική κατάσταση και των δύο γονέων, το μητρικό ιικό φορτίο και η ενδεχόμενη αντική θεραπεία της μητέρας στην κύηση, η μέθοδος του τοκετού (φυσιολογικός ή προγραμματισμένη ή επείγουσα καισαρική τομή) και ο μητρικός θηλασμός πρέπει να είναι διαθέσιμα. Στις περιπτώσεις με θετικούς ορολογικούς δείκτες λοίμωξης, ο προσδιορισμός HBV DNA είναι χρήσιμος για να ανιχνευτούν οι συγκαλυμμένες λοιμώξεις (occult

infections). Στα δείγματα αίματος ο συνδυασμός της μελέτης των γενετικών δεικτών του ανοσιακού συστήματος με τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των επιπέδων ορού των παραγόντων που σχετίζονται με την κάθετη μετάδοση με ELISA, επιβεβαιώνει την επίδραση των γενετικών δεικτών. Η επιλογή των τελευταίων θα μπορούσε να γίνει με την αξιοποίηση ήδη υπάρχοντων δεδομένων από μελέτες συσχέτισης ή με τη χρήση μεθόδων σάρωσης όλου του γονιδιώματος. Τέλος, η απομόνωση περιφερικών λεμφομονοκυττάρων και η μέτρηση των εκκρινόμενων κυτταροκινών μετά από διέγερση τους με ιικά αντιγόνα έχει περιγραφεί στο παρελθόν [100] και μπορεί να παρέχει πληροφορίες για τη λειτουργία των κυττάρων της επίκτητης ανοσίας στα παιδιά με περιγεννητική HBV λοίμωξη.

## 7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας Β στην παιδική ηλικία παραμένει παγκόσμιο πρόβλημα, παρά τη χορήγηση παθητικής και ενεργητικής ανοσοποίησης στα παιδιά που γεννιούνται από HBV θετικές μητέρες. Το μεγαλύτερο ποσοστό των νεογνών (90%) που θα αποκτήσουν τη λοίμωξη περιγεννητικά και ένα σημαντικό ποσοστό των παιδιών (30%) που θα μολυνθούν από τον ιό στα πρώτα 6 χρόνια της ζωής τους θα αναπτύξουν χρόνια λοίμωξη, συγκριτικά με το μικρότερο ποσοστό (10%) των ενηλίκων. Ο κίνδυνος μετάδοσης του HBV από μία HBsAg θετική μητέρα στο βρέφος εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων της χρονικής περιόδου της έκθεσης του νεογνού, της μητρικής φορέας του HBeAg αντιγόνου που συνδέεται με υψηλή μολυσματικότητα και του μητρικού ιικού φορτιού στη γέννηση.

Η συμβολή των γενετικών παραγόντων στην έκβαση της λοίμωξης αναδεικνύεται σε πρόσφατες μελέτες συσχέτισης της νόσου με υποψήφιους γονιδιακούς τόπους. Η συνδεδεμένη στη μαννόζη λεκτίνη (mannose binding lectin-MBL) είναι ένας παράγοντας της εγγενούς ανοσίας, που αποτελεί γνωστό ενεργοποιητή του συμπληρώματος, μετά την σύνδεση με επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες του ιού και μπορεί να ενεργοποιήσει την ιική ωσωνινοποίηση. Οι ποικιλίες του γονιδίου της MBL (*mb12*), συμπεριλαμβανομένων των μονοσημειακών μεταλλαγών στο εξόνιο 1 (κωδικόνιο 54 και 57) και στη θέση -221 του υποκινητή, προκαλούν μείωση της έκφρασης και των επιπέδων της λεκτίνης. Η ανεπάρκεια της MBL έχει συσχετιστεί με αυξημένη ευπάθεια στις λοιμώξεις στη βρεφική ηλικία και φτωχή πρόγνωση της ηπατίτιδας Β και C στην ενήλικη ζωή. Ο παράγοντας νέκρωσης του όγκου (tumour necrosis factor alpha-TNF- $\alpha$ ) είναι επίσης ένας δραστικός παράγοντας ιικής κάθαρσης, καθώς μπορεί να διασπά τα υικά σωματίδια, τα μεταγραφικά πλαίσια και το

επισωματικό κλειστό με ομοιοπολικούς δεσμούς κυκλικό DNA (ccc). Τα επίπεδα TNF- $\alpha$  ορού τροποποιούνται από μία ποικιλία στη θέση -308 του γονιδίου του. Τέλος, η βιταμίνη D επηρεάζει την ιική παρουσίαση μέσω της καταστολής της αντιγονικής έκφρασης και της αναστολής της ενεργοποίησης των T δραστικών κυττάρων με τη μεταγραφική μεσολάβηση του υποδοχέα της VDR. Έτσι χαμηλά επίπεδα ικών αντιγόνων, τα οποία εκφράζονται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, είναι ανεπαρκή να ενεργοποιήσουν τα CD4 T κύτταρα, επαρκή όμως να ενεργοποιήσουν τα κυτταροτοξικά T κύτταρα, τα οποία προκαλούν ηπατική βλάβη χωρίς να επιφέρουν ιική κάθαρση. Δύο γενετικοί τόποι του γονιδίου του VDR, *ApaIA/a* στο ιντρόνιο 8 και *TaqIT/t* στο εξόνιο 9, έχουν ήδη συσχετιστεί με την έκβαση της ηπατίτιδας B στους ενήλικες.

Μελετήθηκε η επίδραση των πολυμορφισμών των γονιδίων *mb12* (Cdn54 GGC σε GAC, Cdn57 GGA σε GAA, -221 G σε C), TNF- $\alpha$  (-308 A σε G) και VDR (*ApaI* G σε T, *TaqI* T σε C) στη μετάδοση της HBV λοίμωξης και στην έκβαση της, δηλαδή την ιική κάθαρση ή την εξέλιξη σε χρόνια νόσο σε 102 παιδιά και έφηβους (53 αγόρια και 49 κορίτσια) ηλικίας 0.5 με 18.5 (μέση ηλικία 9.17) έτη, τα οποία είχαν γεννηθεί από HBV θετικές μητέρες και δεν είχαν λάβει ανοσοπροφύλαξη. Τα παιδιά ελέγχθηκαν ορολογικά για τον HBV και όσα βρέθηκαν θετικά για τον HBsAg ελέγχθηκαν αργότερα για ενδεχόμενη HBsAg ορομετατροπή.

Η ομάδα των χρόνιων παιδιών (παρουσία του HBsAg για διάστημα μεγαλύτερο των 6 μηνών στον ορό) αποτελούνταν από 33 HBsAg θετικά παιδιά, 14 άρρενα και 19 θήλεα, ηλικίας 3.0 με 18.5 ετών (μέση ηλικία 11.4) έτη. Η ομάδα των παιδιών με παλιά λοίμωξη (εξαφάνιση του HBsAg και την ανάπτυξη anti-Hbs αντισωμάτων) περιελάμβανε 36 παιδιά, 17 άρρενα και 19 θήλεα, ηλικίας 0.5 με 18 (μέση ηλικία 9.47) έτη και η ομάδα των παιδιών

χωρίς στοιχεία λοίμωξης αποτελούνταν από 33 παιδιά, 22 άρρενα και 11 θήλεα, ηλικίας 1.0 με 14 (μέση 6.58) έτη. Αρχικά έγινε απομόνωση γενωμικού DNA από ολικό αίμα, ακολούθησαν PCR, RFLP και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Τέλος μετρήθηκαν τα επίπεδα MBL του ορού με τη μέθοδο του ανοσοενζυμικού προσδιορισμού (ELISA) σε δείγματα ορού από 28 παιδιά με χρόνια λοίμωξη, 32 παιδιά με παλιά λοίμωξη και 16 παιδιά ελέγχου. Τα επίπεδα MBL ορίστηκαν χαμηλά όταν ήταν <500 ng/ml και φυσιολογικά όταν ήταν  $\geq$ 500 ng/ml.

Έγινε σύγκριση των συχνοτήτων αλληλομόρφων, των γονοτύπων, των απλοτύπων και των επιπέδων MBL μεταξύ των ομάδων με Fisher's exact probability test και υπολογίστηκαν τα risk ratios (RR) και τα κατά 95% confidence intervals (CI 95%). Αναδείχτηκαν οι παρακάτω διαφορές:

Τα θήλεα άτομα είχαν μεγαλύτερο κίνδυνο να αποκτήσουν τη λοίμωξη συγκριτικά με τα άρρενα άτομα ( $p=0.032$ ) αλλά δεν είχαν διαφορετική πιθανότητα να αναπτύξουν χρόνια HBV λοίμωξη ( $p=0.44$ ).

Δε φάνηκε να διαφέρουν σημαντικά οι συχνότητες των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων στα κωδικόνια 54 και 57 και στη θέση -221 του *mb12* καθώς και η κατανομή των *mb12* απλοτύπων ανάμεσα στις ομάδες. Χαμηλά επίπεδα MBL βρέθηκαν στο 13.2% του ολικού πληθυσμού, σε 10.7% των παιδιών με χρόνια λοίμωξη, 15.6% των παιδιών με παλιά λοίμωξη και 12.5% των παιδιών χωρίς καμία ένδειξη λοίμωξης. Η ανεπάρκεια της MBL που ορίζεται από τους γονότυπους του γονιδίου *mb12* ή από τα επίπεδα ορού της λεκτίνης, φαίνεται να έχει μικρή επίδραση στην πρώιμη HBV λοίμωξη.

Το -308G αλληλόμορφο στο γονίδιο του TNF- $\alpha$  βρέθηκε συχνότερα σε παιδιά με χρόνια λοίμωξη σε σύγκριση με τα παιδιά ελέγχου ( $p=0.050$ ) και στα παιδιά που μολύνθηκαν σε

σύγκριση με εκείνα που δε μολύνθηκαν από τον ιό, παρόλο που δεν έφτασε επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας ( $p=0.089$ ).

Το αλληλόμορφο *VDR ApaI A* βρέθηκε πιο συχνά σε παιδιά με χρόνια λοίμωξη σε σύγκριση με τα παιδιά με παλιά λοίμωξη, παρόλο που το εύρημα δεν έφτασε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ( $p=0.071$ ). Αντίθετα το αλληλόμορφο *VDR ApaI a* μέρος του *VDR ApaI* and *TaqI* απλότυπου *aT* (σε σύγκριση με τους απλότυπους *At* και *AT*) ήταν πιο συχνό εύρημα σε παιδιά με παλιά λοίμωξη από εκείνα με χρονιότητα ( $p=0.049$ ). Οι γενετικοί δείκτες *TaqI* και *ApaI* βρέθηκαν σε «ανισορροπία σύνδεσης» και τρεις μικτοί γονότυποι (*AAtt*, *AaTt*, *aaTT*) ήταν πιο συχνοί με συχνότητες 22.5%, 39.2% and 17.6% αντίστοιχα σε σύγκριση με τους λιγότερο συχνούς γονότυπους *AATt*, *AATT*, *AaTT* (9.8%, 2.9% και 7.8%, αντίστοιχα).

Τα ευρήματα μας υποδεικνύουν ότι το μονοπάτι του TNF- $\alpha$  και πιθανά της vitamin D μπορεί να εμπλέκονται στην εξέλιξη της πρώιμης HBV λοίμωξης. Η συγκεκριμένη μελέτη, όπως όλες οι σχετικές μελέτες συσχέτισης επεκτείνουν την κατανόηση της παθογένειας του HBV στα αρχικά στάδια της ζωής. Η διευκρίνιση της ανοσογενετικής του HBV χρήζει παγκόσμιες πολυπληθυσμιακές μελλοντικές μελέτες, που θα περιλαμβάνουν πολλαπλές ποικιλίες και απλότυπους και θα ενσωματώνουν γενετικά και κλινικά δεδομένα. Οι πολυμορφισμοί μπορεί να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον ως γενετικοί δείκτες στην εκτίμηση της μακροπρόθεσμης πρόγνωσης και την αναγνώριση των ατόμων που ενέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν λοίμωξη και να έχουν φτωχή έκβαση. Οι γενετικές μελέτες συσχέτισης τέλος αφήνουν ελπίδες για την ανάπτυξη αυτοματοποιημένων, γρήγορων και προσιτών εργαλείων στη διαγνωστική και στη θεραπευτική της ηπατίτιδας B.

## 8. SUMMARY

Hepatitis B virus infection in childhood remains a considerable health problem worldwide, even after the introduction of passive and active immunoprophylaxis for children born to HBV positive mothers. The great majority (90%) of newborns that will acquire HBV during their perinatal period and a significant percentage (30%) of children that will acquire HBV infection during their first 6 years of life will develop chronic infection, compared to a lesser degree (10%) of adults. The risk of HBV transmission from an HBsAg positive mother to her infant is associated with different factors including the timing of exposure, the maternal HBeAg carriage associated with significant infectivity and the viral load at birth.

The contribution of genetic factors to the outcome of HBV infection is shown in recent genetic association studies. Mannose binding lectin (MBL) is an innate immunity factor known to activate the complement after binding to HBV surface glycoproteins and to elicit viral opsonisation. Variants in *mb12* gene, including the single point mutations in exon 1 (codons 54 and 57) and at position 221 of the promoter reduce plasma MBL levels. MBL deficiency has been related to increased susceptibility to infections in infants and poor outcome of hepatitis B and C in adults.

Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) is also an efficient factor of HBV clearance, able to disrupt viral particles, transcriptional templates and episomal covalently closed circular DNA. Plasma TNF- $\alpha$  level is modified by a variant at position -308 of its gene. Vitamin D affects viral presentation by suppressing antigen presentation and effector T cells activation in a vitamin D receptor (VDR) transcription-dependent way. Low level of viral antigens, expressed by antigen presenting cells, are unable to induce the CD4 T cells but sufficient to

activate cytotoxic T cells, which mediate liver injury without clearing HBV. Two variants in the VDR gene, *ApaI* A/a at intron 8 and *TaqI* T/t at exon 9, have already been related to the outcome of hepatitis B in adults.

The effect of the *mb12* (Cdn54 GGC to GAC, Cdn57 GGA to GAA, -221 G to C), TNF- $\alpha$  (-308 A to G) and VDR gene (*ApaI* G toT, *TaqI* T to C) variants on the acquisition of HBV infection and the outcome of infection (progress to chronicity or clearance) was studied on 102 children and adolescents (53 male and 49 female), aged 0.5 to 18.5 years (mean age 9.17 years), who were born to HBV positive mothers and had not received immunoprophylaxis. The children were assessed for HBV serology and those found to be HBsAg positive were retested later for potential HBsAg seroconversion. The group of chronic HBV infection (presence of HbsAg for more than 6 months) consisted of 33 HBsAg positive children, 14 male and 19 female, aged 3.0 to 18.5 (mean 11.4) years. The group of spontaneous HBV clearance (disappearance of HbsAg and the development of anti-Hbs antibodies) consisted of 36 children, 17 male and 19 female, aged 0.5 to 18 (mean 9.47) years and the group of naïve subjects consisted of 33 children, 22 male and 11 female, aged 1.0 to 14 (mean 6.58) years. Initially genomic DNA was isolated from whole blood, followed by polymerase chain reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP) methods and electrophoresis in agarose gels. MBL serum levels were determined in 28, 32, and 16 children with HBV chronic infection, clearance and naivety, respectively by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). MBL levels were defined as low when  $<500$  and normal when  $\geq 500$  ng/ml.



The allele, genotype, haplotype frequencies and MBL levels were compared among the groups with Fisher's exact probability test and risk ratios (RR) and 95% confidence intervals (CI) were calculated. The following differences were observed:

Females were at higher risk of acquiring HBV infection than males ( $p=0.032$ ), but not at a different risk of progressing to chronicity ( $p=0.44$ ).

The prevalence of mutant alleles in codons 54 and 57 and at position -221 and the distribution of *mb12* haplotypes did not differ among the study groups. Low serum MBL values were found in 13.2% of the whole cohort, in 10.7% of children with chronic infection, 15.6% of children with HBV clearance and 12.5% of HBV naïve subjects. MBL deficiency as defined by *mb12* genotypes or MBL serum levels was not shown to have significant impact in early HBV infection.

*TNF-alpha-308 G* allele was found more frequently in children with chronic infection than in HBV naïve children ( $p=0.050$ ) and in infected than non-infected children, though not at a significant level ( $p 0.089$ ).

VDR *ApaI A* allele (as compared to *a* allele) was more frequent, though at a marginal level of significance, in children with chronic than in children with resolved infection ( $p=0.071$ ). On the other hand, VDR *ApaI a* allele in VDR *ApaI* and *TaqI* joint haplotype *aT* (as compared to *At* and *AT* haplotypes) was more frequent in children with resolved than in children with chronic infection ( $p=0.049$ ). *TaqI* and *ApaI* markers were found to be in linkage disequilibrium, consistently with the findings of previous studies. Three joint genotypes (*AAtt*, *AaTt*, *aaTT*) were more common exhibiting frequencies of 22.5%, 39.2% and 17.6% compared to the less common genotypes *AATt*, *AATT*, *AaTT* (9.8%, 2.9% and 7.8%, respectively).

Our findings suggest that TNF-alpha and possibly vitamin D pathways may be involved in the progress of early HBV infection. The present study as all genetic association studies provide a better understanding of HBV infection pathogenesis early in life. Future global multicohort studies that will include multiple genetic variations, haplotypes and clinical data are required for the clarification of HBV immunogenetics. Polymorphisms may serve as genetic markers and facilitate the estimation of long-term outcome. Genetic studies raise hopes of the emergence of automated, rapid and affordable tools in the diagnostics and management of hepatitis B.

## **Γ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

## 1. ΕΝΗΜΕΡΗ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ

Δέχομαι να συμμετέχει το παιδί μου στην έρευνα που θα διεξαχθεί στο πανεπιστήμιο της Κρήτης με θέμα την HBV λοίμωξη στα παιδιά.

Ενημερώθηκα για το αντικείμενο της μελέτης από την υπεύθυνη ιατρό, για τις ωφέλειες, τις συνθήκες και τις πιθανές πληροφορίες που θα ανακύψουν για το παιδί μου.

Συμφώνησα με τους όρους:

- Η δειγματοληψία για την έρευνα θα γίνει στα πλαίσια άλλης αιμοληψίας ή σε τακτικό έλεγχο για τη νόσο. Το παιδί μου δε θα υποβληθεί σε επιπλέον ταλαιπωρία και η ποσότητα αίματος που θα ληφθεί δε θα υπερβαίνει τα 5ml.
- Οποτεδήποτε κρίνω απαραίτητο, μπορεί το παιδί μου να αποσυρθεί από τη μελέτη.

Ο/Η γονέας/κηδεμόνας του παιδιού.....

Ο γιατρός.....

## 2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2012; 142(6):1264-1273.
2. Hadziyannis SJ. Natural history of chronic hepatitis B in Euro-Mediterranean and African countries. *J Hepatol* 2011; 55(1):183-191.
3. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Virological techniques for the diagnosis and monitoring of hepatitis B and C. *Ann Hepatol* 2009; 8(1):7-12.
4. Abdel-Hady M, Kelly D. Chronic Hepatitis B in Children and Adolescents: Epidemiology and Management. *Paediatr Drugs* 2013.
5. Dumpis U, Holmes EC, Mendy M, Hill A, Thursz M, Hall A et al. Transmission of hepatitis B virus infection in Gambian families revealed by phylogenetic analysis. *J Hepatol* 2001; 35(1):99-104.
6. Guo Z, Shi XH, Feng YL, Wang B, Feng LP, Wang SP et al. Risk factors of HBV intrauterine transmission among HBsAg-positive pregnant women. *J Viral Hepat* 2013; 20(5):317-321.
7. Burk RD, Hwang LY, Ho GY, Shafritz DA, Beasley RP. Outcome of perinatal hepatitis B virus exposure is dependent on maternal virus load. *J Infect Dis* 1994; 170(6):1418-1423.
8. Ranger-Rogez S, Alain S, Denis F. [Hepatitis viruses: mother to child transmission]. *Pathol Biol (Paris)* 2002; 50(9):568-575.
9. ACOG Practice Bulletin No. 86: Viral hepatitis in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2007; 110(4):941-956.
10. Zheng Y, Lu Y, Ye Q, Xia Y, Zhou Y, Yao Q et al. Should chronic hepatitis B mothers breastfeed? a meta analysis. *BMC Public Health* 2011; 11:502.
11. Levy O, Zarembek KA, Roy RM, Cywes C, Godowski PJ, Wessels MR. Selective impairment of TLR-mediated innate immunity in human newborns: neonatal blood plasma reduces monocyte TNF-alpha induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharide, and imiquimod, but preserves the response to R-848. *J Immunol* 2004; 173(7):4627-4634.
12. Firth MA, Shewen PE, Hodgins DC. Passive and active components of neonatal innate immune defenses. *Anim Health Res Rev* 2005; 6(2):143-158.
13. Koenig JM, Stegner JJ, Schmeck AC, Saxonhouse MA, Kenigsberg LE. Neonatal neutrophils with prolonged survival exhibit enhanced inflammatory and cytotoxic responsiveness. *Pediatr Res* 2005; 57(3):424-429.

14. Milich D, Liang TJ. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2003; 38(5):1075-1086.
15. Milich DR, Chen MK, Hughes JL, Jones JE. The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence. *J Immunol* 1998; 160(4):2013-2021.
16. Milich DR, Wolf SF, Hughes JL, Jones JE. Interleukin 12 suppresses autoantibody production by reversing helper T-cell phenotype in hepatitis B e antigen transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(15):6847-6851.
17. Ferrari C, Missale G, Boni C, Urbani S. Immunopathogenesis of hepatitis B. *J Hepatol* 2003; 39 Suppl 1:S36-S42.
18. Lin J, Liu KY. Linkage and association analyses of microsatellites and single-nucleotide polymorphisms in nuclear families. *BMC Genet* 2005; 6 Suppl 1:S25.
19. Hann HW, Kim CY, London WT, Whitford P, Blumberg BS. Hepatitis B virus and primary hepatocellular carcinoma: family studies in Korea. *Int J Cancer* 1982; 30(1):47-51.
20. Lin TM, Chen CJ, Wu MM, Yang CS, Chen JS, Lin CC et al. Hepatitis B virus markers in Chinese twins. *Anticancer Res* 1989; 9(3):737-741.
21. Tong MJ, Weiner JM, Ashcavai MW, Redeker AG, Comparini S, Vyas GN. A comparative study of hepatitis B viral markers in the family members of Asian and non-Asian patients with hepatitis B surface antigen-positive hepatocellular carcinoma and with chronic hepatitis B infection. *J Infect Dis* 1979; 140(4):506-512.
22. Demir G, Belentepe S, Ozguroglu M, Celik AF, Sayhan N, Tekin S et al. Simultaneous presentation of hepatocellular carcinoma in identical twin brothers. *Med Oncol* 2002; 19(2):113-116.
23. Hirschhorn JN, Daly MJ. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet* 2005; 6(2):95-108.
24. Carey I, Vergani D. The role of viral-specific immune responses on the outcome of chronic hepatitis B (HBV) infection in children: new insights into immunopathology. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 45(1):15-18.
25. Chong WP, To YF, Ip WK, Yuen MF, Poon TP, Wong WH et al. Mannose-binding lectin in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2005; 42(5):1037-1045.
26. Fraser DA, Bohlsos SS, Jasinskiene N, Rawal N, Palmarini G, Ruiz S et al. C1q and MBL, components of the innate immune system, influence monocyte cytokine expression. *J Leukoc Biol* 2006; 80(1):107-116.
27. Turner MW. Mannose-binding lectin (MBL) in health and disease. *Immunobiology* 1998; 199(2):327-339.

28. Brown KS, Ryder SD, Irving WL, Sim RB, Hickling TP. Mannan binding lectin and viral hepatitis. *Immunol Lett* 2007; 108(1):34-44.
29. Israels J, Frakking FN, Kremer LC, Offringa M, Kuijpers TW, van de Wetering MD. Mannose-binding lectin and infection risk in newborns: a systematic review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2010; 95(6):F452-F461.
30. Koch A, Melbye M, Sorensen P, Homoe P, Madsen HO, Molbak K et al. Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. *JAMA* 2001; 285(10):1316-1321.
31. Boniotto M, Braida L, Pirulli D, Arraes L, Amoroso A, Crovella S. MBL2 polymorphisms are involved in HIV-1 infection in Brazilian perinatally infected children. *AIDS* 2003; 17(5):779-780.
32. Hibberd ML, Sumiya M, Summerfield JA, Booy R, Levin M. Association of variants of the gene for mannose-binding lectin with susceptibility to meningococcal disease. Meningococcal Research Group. *Lancet* 1999; 353(9158):1049-1053.
33. Bevilacqua E, Fabris A, Floreano P, Pembrey L, Newell ML, Tovo PA et al. Genetic factors in mother-to-child transmission of HCV infection. *Virology* 2009; 390(1):64-70.
34. Safioleas M, Lygidakis NJ, Manti C. Hepatitis B today. *Hepatogastroenterology* 2007; 54(74):545-548.
35. Chang JJ, Lewin SR. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *Immunol Cell Biol* 2007; 85(1):16-23.
36. Thursz MR, Kwiatkowski D, Allsopp CE, Greenwood BM, Thomas HC, Hill AV. Association between an MHC class II allele and clearance of hepatitis B virus in the Gambia. *N Engl J Med* 1995; 332(16):1065-1069.
37. Martin MP, Carrington M. Immunogenetics of viral infections. *Curr Opin Immunol* 2005; 17(5):510-516.
38. Singh R, Kaul R, Kaul A, Khan K. A comparative review of HLA associations with hepatitis B and C viral infections across global populations. *World J Gastroenterol* 2007; 13(12):1770-1787.
39. Liu HY, Kong BH, Luo X, Xu YP, Dai MS, Jiang S. [Study on the association between maternal-infantile vertical transmission of hepatitis B virus and human leukocyte antigen DR gene domain]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2003; 38(10):599-603.
40. Xu YY, Yu JY, Zhong YW, Song HB, Liu HH, Jia LL et al. Association between the frequency of class II HLA antigens and the susceptibility to intrauterine infection of hepatitis B virus. *Int J Biol Sci* 2008; 4(2):111-115.

41. Wieland SF, Guidotti LG, Chisari FV. Intrahepatic induction of alpha/beta interferon eliminates viral RNA-containing capsids in hepatitis B virus transgenic mice. *J Virol* 2000; 74(9):4165-4173.
42. Whitten TM, Quets AT, Schloemer RH. Identification of the hepatitis B virus factor that inhibits expression of the beta interferon gene. *J Virol* 1991; 65(9):4699-4704.
43. Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 2004; 202:8-32.
44. Frodsham AJ, Zhang L, Dumpis U, Taib NA, Best S, Durham A et al. Class II cytokine receptor gene cluster is a major locus for hepatitis B persistence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(24):9148-9153.
45. Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997; 337(24):1733-1745.
46. Zhou J, Smith DK, Lu L, Poon VK, Ng F, Chen DQ et al. A non-synonymous single nucleotide polymorphism in IFNAR1 affects susceptibility to chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* 2009; 16(1):45-52.
47. Barnaba V, Franco A, Alberti A, Benvenuto R, Balsano F. Selective killing of hepatitis B envelope antigen-specific B cells by class I-restricted, exogenous antigen-specific T lymphocytes. *Nature* 1990; 345(6272):258-260.
48. Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R, Chisari FV. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* 1999; 284(5415):825-829.
49. Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchinson IV. In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. *Eur J Immunogenet* 1999; 26(1):1-3.
50. Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum Immunol* 2000; 61(9):863-866.
51. Abbott W, Gane E, Winship I, Munn S, Tukuitonga C. Polymorphism in intron 1 of the interferon-gamma gene influences both serum immunoglobulin E levels and the risk for chronic hepatitis B virus infection in Polynesians. *Immunogenetics* 2007; 59(3):187-195.
52. Yu H, Zhu QR, Gu SQ, Fei LE, Pu DB. [Association of interferon-gamma + 874 gene single nucleotide polymorphism with susceptibility to intrauterine HBV infection]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2004; 42(6):421-423.
53. Biermer M, Puro R, Schneider RJ. Tumor necrosis factor alpha inhibition of hepatitis B virus replication involves disruption of capsid Integrity through activation of NF-kappaB. *J Virol* 2003; 77(7):4033-4042.



54. Kim YJ, Lee HS, Yoon JH, Kim CY, Park MH, Kim LH et al. Association of TNF-alpha promoter polymorphisms with the clearance of hepatitis B virus infection. *Hum Mol Genet* 2003; 12(19):2541-2546.
55. Elahi MM, Asotra K, Matata BM, Mastana SS. Tumor necrosis factor alpha -308 gene locus promoter polymorphism: an analysis of association with health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792(3):163-172.
56. Cheong JY, Cho SW, Hwang IL, Yoon SK, Lee JH, Park CS et al. Association between chronic hepatitis B virus infection and interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphisms. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21(7):1163-1169.
57. Niro GA, Fontana R, Gioffreda D, Valvano MR, Lacobellis A, Facciorusso D et al. Tumor necrosis factor gene polymorphisms and clearance or progression of hepatitis B virus infection. *Liver Int* 2005; 25(6):1175-1181.
58. Du T, Guo XH, Zhu XL, Li JH, Lu LP, Gao JR et al. Association of TNF-alpha promoter polymorphisms with the outcomes of hepatitis B virus infection in Chinese Han population. *J Viral Hepat* 2006; 13(9):618-624.
59. Gu SQ, Zhu QR, Yu H, Fei LE, Dong ZQ, Pu DP. [Relationship between genetic polymorphism of tumor necrosis factor-alpha and susceptibility to intrauterine HBV infection]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2004; 12(9):538-539.
60. Zhu QR, Gu SQ, Yu H, Wang JS, Gu XH, Dong ZQ et al. [Relationship between cytokine gene polymorphism and susceptibility to hepatitis B virus intrauterine infection]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2005; 26(4):236-239.
61. Ahn SH, Kim dY, Chang HY, Hong SP, Shin JS, Kim YS et al. Association of genetic variations in CCR5 and its ligand, RANTES with clearance of hepatitis B virus in Korea. *J Med Virol* 2006; 78(12):1564-1571.
62. Pedersen BR, Kamwendo D, Blood M, Mwapasa V, Molyneux M, North K et al. CCR5 haplotypes and mother-to-child HIV transmission in Malawi. *PLoS One* 2007; 2(9):e838.
63. Walker VP, Modlin RL. The vitamin D connection to pediatric infections and immune function. *Pediatr Res* 2009; 65(5 Pt 2):106R-113R.
64. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 2004; 338(2):143-156.
65. Liu M, Cao B, Zhang H, Dai Y, Liu X, Xu C. Association of interferon-gamma gene haplotype in the Chinese population with hepatitis B virus infection. *Immunogenetics* 2006; 58(11):859-864.
66. Shan J, Wang L, Li Z, Liu Y, Gao JR, Pang YL et al. [Relationship between polymorphisms of vitamin D receptor gene and familial aggregation of HBsAg carriers]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2006; 28(2):148-153.

67. Suneetha PV, Sarin SK, Goyal A, Kumar GT, Shukla DK, Hissar S. Association between vitamin D receptor, CCR5, TNF-alpha and TNF-beta gene polymorphisms and HBV infection and severity of liver disease. *J Hepatol* 2006; 44(5):856-863.
68. Huang YW, Liao YT, Chen W, Chen CL, Hu JT, Liu CJ et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and distinct clinical phenotypes of hepatitis B carriers in Taiwan. *Genes Immun* 2010; 11(1):87-93.
69. Craxi A, Montano L, Goodall A, Thomas HC. Genetic and sex-linked factors influencing HBs antigen clearance. I. Nonimmune clearance in inbred strains of mice. *J Med Virol* 1982; 9(2):117-123.
70. Deng G, Zhou G, Zhai Y, Li S, Li X, Li Y et al. Association of estrogen receptor alpha polymorphisms with susceptibility to chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2004; 40(2):318-326.
71. Hohler T, Reuss E, Evers N, Dietrich E, Rittner C, Freitag CM et al. Differential genetic determination of immune responsiveness to hepatitis B surface antigen and to hepatitis A virus: a vaccination study in twins. *Lancet* 2002; 360(9338):991-995.
72. Kimman TG, Vandebriel RJ, Hoebee B. Genetic variation in the response to vaccination. *Community Genet* 2007; 10(4):201-217.
73. Martinetti M, De SA, Belloni C, Pasi A, Tinelli C, Pistorio A et al. Humoral response to recombinant hepatitis B virus vaccine at birth: role of HLA and beyond. *Clin Immunol* 2000; 97(3):234-240.
74. Deulofeut H, Iglesias A, Mikael N, Bing DH, Awdeh Z, Yunis J et al. Cellular recognition and HLA restriction of a midsequence HBsAg peptide in hepatitis B vaccinated individuals. *Mol Immunol* 1993; 30(10):941-948.
75. Hennig BJ, Fielding K, Broxholme J, Diatta M, Mendy M, Moore C et al. Host genetic factors and vaccine-induced immunity to hepatitis B virus infection. *PLoS One* 2008; 3(3):e1898.
76. Poland GA, Ovsyannikova IG, Jacobson RM. Personalized vaccines: the emerging field of vaccinomics. *Expert Opin Biol Ther* 2008; 8(11):1659-1667.
77. Yu H, Zhu QR, Gu SQ, Fei LE. Relationship between IFN-gamma gene polymorphism and susceptibility to intrauterine HBV infection. *World J Gastroenterol* 2006; 12(18):2928-2931.
78. Koutsounaki E, Goulielmos GN, Koulentaki M, Choulaki C, Kouroumalis E, Galanakis E. Mannose-binding lectin MBL2 gene polymorphisms and outcome of hepatitis C virus-infected patients. *J Clin Immunol* 2008; 28(5):495-500.
79. Panierakis C, Goulielmos G, Mamoulakis D, Petraki E, Papavasiliou E, Galanakis E. Vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Crete, Greece. *Clin Immunol* 2009; 133(2):276-281.

80. Savvidou A, Bitsori M, Choumerianou DM, Karatzi M, Kalmanti M, Galanakis E. Polymorphisms of the TNF-alpha and ACE genes, and renal scarring in infants with urinary tract infection. *J Urol* 2010; 183(2):684-687.
81. Zacharakis G, Kotsiou S, Papoutselis M, Vafiadis N, Tzara F, Pouliou E et al. Changes in the epidemiology of hepatitis B virus infection following the implementation of immunisation programmes in northeastern Greece. *Euro Surveill* 2009; 14(32).
82. Ponde RA, Cardoso DD, Ferro MO. The underlying mechanisms for the 'anti-HBc alone' serological profile. *Arch Virol* 2010; 155(2):149-158.
83. Ruskamp JM, Hoekstra MO, Postma DS, Kerkhof M, Bottema RW, Koppelman GH et al. Polymorphisms in the mannan-binding lectin gene are not associated with questionnaire-reported respiratory tract infections in children. *J Infect Dis* 2008; 198(11):1707-1713.
84. Fang Y, van Meurs JB, d'Alesio A, Jhamai M, Zhao H, Rivadeneira F et al. Promoter and 3'-untranslated-region haplotypes in the vitamin d receptor gene predispose to osteoporotic fracture: the rotterdam study. *Am J Hum Genet* 2005; 77(5):807-823.
85. Fischler B, Nystrom J, Bjornsdottir T, Lindh G, Hultgren C. Virus-specific T cell immune response in children and adolescents with chronic hepatitis B virus infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 45(1):75-83.
86. Koumbi L, Bertoletti A, Anastasiadou V, Machaira M, Goh W, Papadopoulos NG et al. Hepatitis B-specific T helper cell responses in uninfected infants born to HBsAg+/HBeAg-mothers. *Cell Mol Immunol* 2010; 7(6):454-458.
87. Pantazis KD, Elefsiniotis IS, Brokalaki H. New data concerning the epidemiology of Hepatitis B virus infection in Greece. *Gastroenterol Res Pract* 2008; 2008:580341.
88. Tao R, Hua CZ, Hu YZ, Shang SQ. Genetic polymorphisms and serum levels of mannose-binding lectin in Chinese pediatric patients with common infectious diseases. *Int J Infect Dis* 2012; 16(5):e403-e407.
89. Thomas HC, Foster GR, Sumiya M, McIntosh D, Jack DL, Turner MW et al. Mutation of gene of mannose-binding protein associated with chronic hepatitis B viral infection. *Lancet* 1996; 348(9039):1417-1419.
90. Madsen HO, Garred P, Thiel S, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP et al. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannose-binding protein. *J Immunol* 1995; 155(6):3013-3020.
91. Thio CL, Mosbrugger T, Astemborski J, Greer S, Kirk GD, O'Brien SJ et al. Mannose binding lectin genotypes influence recovery from hepatitis B virus infection. *J Virol* 2005; 79(14):9192-9196.
92. Peterslund NA, Koch C, Jensenius JC, Thiel S. Association between deficiency of mannose-binding lectin and severe infections after chemotherapy. *Lancet* 2001; 358(9282):637-638.

93. Neth O, Hann I, Turner MW, Klein NJ. Deficiency of mannose-binding lectin and burden of infection in children with malignancy: a prospective study. *Lancet* 2001; 358(9282):614-618.
94. Kruse C, Rosgaard A, Steffensen R, Varming K, Jensenius JC, Christiansen OB. Low serum level of mannan-binding lectin is a determinant for pregnancy outcome in women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187(5):1313-1320.
95. Thiel S, Holmskov U, Hviid L, Laursen SB, Jensenius JC. The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during an acute phase response. *Clin Exp Immunol* 1992; 90(1):31-35.
96. Marino MW, Dunn A, Grail D, Inglese M, Noguchi Y, Richards E et al. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(15):8093-8098.
97. Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F et al. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA* 1999; 282(6):561-568.
98. Hartel C, Hemmelmann C, Faust K, Gebauer C, Hoehn T, Kribs A et al. Tumor necrosis factor-alpha promoter -308 G/A polymorphism and susceptibility to sepsis in very-low-birth-weight infants. *Crit Care Med* 2011; 39(5):1190-1195.
99. Mastana SS, Sokol RJ. Genetic variation in the east Midlands. *Ann Hum Biol* 1998; 25(1):43-68.
100. Hsu HY, Chang MH, Ni YH, Lee PI. Cytokine release of peripheral blood mononuclear cells in children with chronic hepatitis B virus infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 29(5):540-545.
101. Lin R, White JH. The pleiotropic actions of vitamin D. *Bioessays* 2004; 26(1):21-28.
102. McGrath JJ, Saha S, Burne TH, Eyles DW. A systematic review of the association between common single nucleotide polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D concentrations. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 121(1-2):471-477.
103. Wilkinson RJ, Llewelyn M, Toossi Z, Patel P, Pasvol G, Lalvani A et al. Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study. *Lancet* 2000; 355(9204):618-621.
104. Villamor E. A potential role for vitamin D on HIV infection? *Nutr Rev* 2006; 64(5 Pt 1):226-233.
105. Chesney RW. Vitamin D and The Magic Mountain: the anti-infectious role of the vitamin. *J Pediatr* 2010; 156(5):698-703.

106. Janssen R, Bont L, Siezen CL, Hodemaekers HM, Ermers MJ, Doornbos G et al. Genetic susceptibility to respiratory syncytial virus bronchiolitis is predominantly associated with innate immune genes. *J Infect Dis* 2007; 196(6):826-834.
107. Roth DE, Jones AB, Prosser C, Robinson JL, Vohra S. Vitamin D receptor polymorphisms and the risk of acute lower respiratory tract infection in early childhood. *J Infect Dis* 2008; 197(5):676-680.
108. Aslan S, Akil I, Aslan G, Onay H, Ozyurt BC, Ozkinay F. Vitamin D receptor gene polymorphism in children with urinary tract infection. *Pediatr Nephrol* 2012; 27(3):417-421.
109. de la Torre MS, Torres C, Nieto G, Vergara S, Carrero AJ, Macias J et al. Vitamin D receptor gene haplotypes and susceptibility to HIV-1 infection in injection drug users. *J Infect Dis* 2008; 197(3):405-410.
110. Gal-Tanamy M, Bachmetov L, Ravid A, Koren R, Erman A, Tur-Kaspa R et al. Vitamin D: an innate antiviral agent suppressing hepatitis C virus in human hepatocytes. *Hepatology* 2011; 54(5):1570-1579.
111. Matsumura T, Kato T, Sugiyama N, Tasaka-Fujita M, Murayama A, Masaki T et al. 25-Hydroxyvitamin D3 suppresses hepatitis C virus production. *Hepatology* 2012; 56(4):1231-1239.
112. Bitetto D, Fattovich G, Fabris C, Ceriani E, Falletti E, Fornasiero E et al. Complementary role of vitamin D deficiency and the interleukin-28B rs12979860 C/T polymorphism in predicting antiviral response in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2011; 53(4):1118-1126.
113. Baur K, Mertens JC, Schmitt J, Iwata R, Stieger B, Eloranta JJ et al. Combined effect of 25-OH vitamin D plasma levels and genetic vitamin D receptor (NR 11) variants on fibrosis progression rate in HCV patients. *Liver Int* 2012; 32(4):635-643.
114. Staeva-Vieira TP, Freedman LP. 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits IFN-gamma and IL-4 levels during in vitro polarization of primary murine CD4+ T cells. *J Immunol* 2002; 168(3):1181-1189.
115. Zhu Q, Li N, Han Q, Li Z, Zhang G, Li F et al. Single-nucleotide polymorphism at CYP27B1-1260, but not VDR Taq I, is possibly associated with persistent hepatitis B virus infection. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012; 16(9):1115-1121.
116. Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KP, Thursz M, Whittle HC et al. Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene. *J Infect Dis* 1999; 179(3):721-724.
117. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994; 367(6460):284-287.

118. Dong Y, Stallmann-Jorgensen IS, Pollock NK, Harris RA, Keeton D, Huang Y et al. A 16-week randomized clinical trial of 2000 international units daily vitamin D3 supplementation in black youth: 25-hydroxyvitamin D, adiposity, and arterial stiffness. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(10):4584-4591.
119. Ogunkolade BW, Boucher BJ, Prael JM, Bustin SA, Burrin JM, Noonan K et al. Vitamin D receptor (VDR) mRNA and VDR protein levels in relation to vitamin D status, insulin secretory capacity, and VDR genotype in Bangladeshi Asians. *Diabetes* 2002; 51(7):2294-2300.
120. Koulentaki M, Ergazaki M, Moschandrea J, Spanoudakis S, Tzagarakis N, Drandakis PE et al. Prevalence of hepatitis B and C markers in high-risk hospitalised patients in Crete: a five-year observational study. *BMC Public Health* 2001; 1:17.
121. Robinson T, Bullen C, Humphries W, Hornell J, Moyes C. The New Zealand Hepatitis B Screening Programme: screening coverage and prevalence of chronic hepatitis B infection. *N Z Med J* 2005; 118(1211):U1345.
122. Rifai K, Hadem J, Wiegand J, Potthoff A, Pischke S, Klempnauer J et al. Gender differences in patient receiving liver transplantation for viral hepatitis. *Z Gastroenterol* 2012; 50(8):760-765.
123. Tsay PK, Tai DI, Chen YM, Yu CP, Wan SY, Shen YJ et al. Impact of gender, viral transmission and aging in the prevalence of hepatitis B surface antigen. *Chang Gung Med J* 2009; 32(2):155-164.
124. Biggar RJ, Taha TE, Hoover DR, Yellin F, Kumwenda N, Broadhead R. Higher in utero and perinatal HIV infection risk in girls than boys. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 41(4):509-513.
125. Ni YH. Natural history of hepatitis B virus infection: pediatric perspective. *J Gastroenterol* 2011; 46(1):1-8.
126. Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di IJ, Mueller T et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology* 2010; 138(4):1338-45, 1345.
127. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009; 461(7265):798-801.
128. Kamatani Y, Wattanapokayakit S, Ochi H, Kawaguchi T, Takahashi A, Hosono N et al. A genome-wide association study identifies variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B in Asians. *Nat Genet* 2009; 41(5):591-595.
129. Elefsiniotis IS, Glynou I, Brokalaki H, Magaziotou I, Pantazis KD, Fotiou A et al. Serological and virological profile of chronic HBV infected women at reproductive age in Greece. A two-year single center study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2007; 132(2):200-203.

### **3. ΔΙΕΘΝΕΙΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

# Hepatitis B Virus Acquisition and Pathogenesis in Childhood: Host Genetic Determinants

\*V. Chatzidaki, †E. Kouroumalis, and \*E. Galanakis

## ABSTRACT

The clinical course of hepatitis B virus (HBV) infection varies from spontaneous recovery to chronic persistent infection leading to severe liver injury. Mounting evidence has recently highlighted the influence of host genotype in the complex interplay between viral and host factors. Studies in adults have suggested the existence of a genetic predisposition to HBV infection secondary to certain defects in the host response. These defects include opsonic deficiency, compromised antigen processing and presentation by human leucocyte antigen variations, attenuated T- and B-cell response, impaired cytokine and chemokine release, and production of receptors for several pertinent factors such as vitamin D and estrogen. By contrast, little is known about the genetic factors involved in the susceptibility to HBV transmission in early childhood. Herein, we review the literature regarding the association between host genetics and susceptibility to primary HBV infection, and we discuss the prospects of investigation in this field. A better understanding of HBV infection immunopathogenesis in the critical period of infancy may allow the development of optimal and innovative prevention and treatment.

**Key Words:** HBV, childhood, gene polymorphisms, susceptibility

(*JPGN* 2011;52: 3–8)

**H**epatitis B virus (HBV) infection has a global health burden because more than 350 million people have been infected with long-term liver infections worldwide (1). The clinical manifestations of the disease range from acute asymptomatic infection to long-term active liver disease complicated with primary liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Among infected individuals, a proportion will develop spontaneous hepatitis B surface antigen (HBsAg) seroconversion after a short duration of illness, whereas others will establish long-term HBV infection. Long-term infection has recently been classified into 5 phases: the immune tolerant, the immune reactive, the inactive carrier state, the HBV precore antigen (HBeAg)-negative, and the HBsAg-negative chronic HB. Perinatally infected individuals are unable to mount a vigorous immune response to eliminate the virus and thus remain for years in the immune tolerant phase with high HBV viral load and mild hepatic disease. The immune reactive stage is linked to enhanced cellular immune response, control of viral replication, and aggravation of liver injury. Seroconversion to anti-HBe may lead to low viremic inactive carrier

state and favorable long-term outcome or to progression to HBeAg-negative active liver disease (2).

Age at HBV acquisition is a major determinant of the outcome upon infection; the great majority (90%) of neonates who acquire HBV perinatally develop chronic infection, as compared with the 30% of children who acquire the virus in the first 6 years of life and only 5% to 10% of adults. Infection in early life substantially affects HBV endemicity, and it contributes disproportionately to the fuelling of the reservoir of chronic carriers who can initiate new cycles of transmission. Despite the establishment of passive immunoprophylaxis and effective immunization for neonates born to HBsAg-positive mothers, child morbidities and mortalities due to HBV remain high in endemic countries (3). The risk of mother-to-child transmission (MTCT) depends on several factors, including obstetrics parameters, maternal viral load, and viral factors. This notwithstanding, all of the above do not provide a full explanation of why some infants become infected and long-term carriers, whereas others are not affected or develop spontaneous clearance. Increasing evidence supports the influence of the infantile genetic background on the risk of HBV acquisition and persistence.

## EPIDEMIOLOGIC EVIDENCE FOR HEREDITARY SUSCEPTIBILITY

The diverse HBV epidemiology in different ethnic populations living in the same areas points to the contribution of genetic factors, supported by additional evidence of family clustering of HBV (4). The concordance of HBsAg carriage in Chinese twins has been found higher in monozygotic than in dizygotic twins and in pairs of singleton births (5). Additionally, blood relatives were found to be more prone to develop HBV infection than nonblood relatives, and the HBsAg carrier rate decreases in order of the first-, second-, and third-degree relatives instead of being equal, which would point to a disease with principally environmental basis (6,7). A report of simultaneous presentation of monozygotic twin brothers with HBV-associated hepatocellular carcinoma points to a similar genetic effect on disease progression (8).

## SELECTING THE GENETIC MARKERS FOR SCREENING

HBV infection and clearance patterns obviously should be regarded as a complex trait. The contributing variation in human genome presents in different forms; the most common natural sequence variations are the single nucleotide polymorphisms (SNPs) representing the stable substitution of a single base. Other forms are the microsatellites, in which a short sequence repeat is bound, so that 1 individual may have 10 and 12 copies of the repeating motif and another individual 9 and 11 copies (9), and the interindividual copy number variants, referring to deletions and duplications of DNA strands of between a few hundred and several million base pairs. Recent advances in molecular genetics based on

Received May 2, 2010; accepted August 30, 2010.

From the \*Department of Paediatrics, and the †Department of Gastroenterology; University of Crete, POB 2208, Heraklion, Crete, Greece.

Address correspondence and reprint requests to E. Galanakis, Department of Paediatrics, University of Crete, PO Box 2208, Heraklion, Crete, Greece (e-mail: emmgalan@med.uoc.gr).

The authors report no conflicts of interest.

Copyright © 2010 by European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition

DOI: 10.1097/MPG.0b013e3181fb0cb9



TABLE 1. Association of HLA alleles with the susceptibility to HBV

HLA complex	Association	Studied population	References
<b>HLA class I</b>			
A *02, *0301,*11	Viral clearance	Adults	(70,71)
B *08, *18,*35	HBV persistence	Adults	(70,71)
<b>HLA class II</b>			
<i>HLA DR</i>			
<i>DRB1*1</i>	Response to HBV immunization	Infants, adults	(46,61)
<i>DRB1*03</i>	Vertical transmission	Infants	(23)
	Response to vaccination	Infants	(48)
	Nonresponse to vaccination	Adults	(61)
<i>DRB1*07</i>	Intrauterine infection	Infants	(24)
	Nonresponse to full vaccination	Adolescents	(49)
	Chronic infection	Adults	(62,63)
<i>DRB1*11</i>	Response to immunization	Infants	(46)
	Viral persistence	Adults	(64)
<i>DRB1*13(01/02)</i>	Viral clearance	Adults, children	(20,64–68)
<i>DRB1*15</i>	Response to vaccination	Infants, adolescents, adults	(46,61,43)
<i>HLA DQ</i>			
<i>DQB1*02</i>	Nonresponse to vaccination	Infants, adults	(48,69)
<i>DQB1*06</i>	Response to vaccination	Adolescents	(49)

HBV = hepatitis B virus; HLA = human leucocyte antigen.

polymerase chain reaction technology have permitted the rapid detection of genetic variations. Among the strategies used to identify genetic markers involved in a disease phenotype are the candidate gene method and the genomewide association approaches (10). The most common approach used in HBV infection has been the association with candidate genes. Candidate genetic regions for HBV infection are genes that determine host response, genes related to MTCT, and genes that contribute to resistance to antivirals and vaccine response. A limited number of studies have detected

associations between HBV infection in children and the candidate genetic loci (Tables 1 and 2).

## PATHWAYS OF HOST IMMUNE RESPONSE

The majority of infected young children remain in the immune tolerant phase of chronic infection for years. Immunological pathways that are more likely to be attenuated include those involved in the early phase of infection, the resolution of the acute

TABLE 2. Association of non-HLA alleles with susceptibility to HBV infection

### Innate immunity

Mannose-binding lectin: SNPs in *mb12* coding and promoter regions related to HB susceptibility and severity in adults (16)

### Interferons

*IFNAR1 19158 C/G* SNP in linkage disequilibrium with  $-668/-77$  polymorphisms affects the clinical outcome of HBV infection in adults (28)

*12IFN-γ CA* repeat allele, and *+874T* allele more common in HBV resolution group than in adult long-term carriers, respectively (31,41)

*IFN-γ+874AA* genotype linked to intrauterine infection; *IFN-γ CA* repeat less common in vertically infected individuals (32,33)

### Cytokines and chemokines

TNF- $\alpha$ :  $-238G$  allele of promoter region associated with HBV persistence (34); *308 G* allele more common in infected adults and chronic carriers (35,36);  $-238A$  allele related to intrauterine infection in infants born to HBV-positive mothers (37)

IL-10:  $-1082G$  allele protective in infants born to HBV-positive mothers (38)

RANTES: allele *59029G* of receptor promoter associated with HBV clearance in adults (39)

*IFN-γ*, MAPK8, and IL10RA related to anti-HBs titer in vaccinated infants; CD163 associated to anti-HBc seroconversion (51)

### Immunoregulatory factors

Vitamin D receptor: genotypes *TaqI T* and *FokI F*, and *T-C* haplotype more prevalent in patients with long-term HBV and case families compared with healthy controls (41,42)

Estrogens: *29T/T* of ESR1 associated with transition to long-term HBV carriage in adults (45)

CCND2: *CCND2-171T4C* allele and haplotype *1[T-C-T-A-T]* linked to HBV clearance in adults (43)

A = adenine; anti-HBs = hepatitis surface antibodies; C = cytosine; CCND2 = cyclin D type 2; ESR = estrogen receptor; G = guanine; HB = hepatitis B; HbcAg = HBV core antigen; HBV = hepatitis B virus; *IFN-γ* = interferon-gamma; *IFNAR* = interferon alpha receptor; IL = interleukin; MAPK8 = mitogen-activated protein kinase 8; SNP = single nucleotide polymorphism; T = thymine; TNF- $\alpha$  = tumor necrosis factor-alpha.

phase, or the progress to chronic infection. All during this process, the coordinated activation of innate, adaptive immunity and antiviral, immunoregulatory cytokines is required for the development of neutralizing antibodies, the clearance of HBV antigens, and the expansion of HBV-specific memory T cells.

## Innate Immunity

Innate immunity has a substantial role in HBV infection in infancy because adaptive immunity is still immature (11). Genetic variants of HBV pattern-recognition molecules, such as the mannose-binding lectin (MBL), are known to increase the susceptibility to several infectious diseases in childhood (11–13). MBL is the major factor of the lectin pathway of the complement, binding to the middle surface protein of HBV viral envelope, enhancing phagocytosis (14) and modulating the expression of cytokines in monocytes (15). Among the several nucleotide substitutions in MBL gene (*mb12*), those in exons (codon 52, 54, 57 in exon 1, codon 3130 in exon 4) and in the promoter region (position –550, –221, 4) have the greatest effect on the expression of MBL. The studies of MBL polymorphisms in HBV infection in adults indicate that MBL genotypes with low levels of functional protein are related to unfavorable prognosis, such as viral persistence and disease progression, whereas alleles that encode high levels of MBL are related to virus clearance (16). So far, there are no data linking MBL to susceptibility to HBV infection in childhood or the perinatal period. Interestingly, a recent study of MBL variants in mother-to-child hepatitis C virus infection revealed their equal distribution among vertically infected and noninfected newborn infants (17).

## Cellular Immunity

Major histocompatibility complex is the main mediator of antigen presentation, the most polymorphic locus in the human genome, and appears to be an ideal candidate for disease association studies (18). Mounting evidence derived from the study of different populations suggests that human leucocyte antigen (HLA) class I-restricted T-cytotoxic cells and HLA class II-restricted T-helper cells have a pertinent role in HBV pathogenesis (19). There are several associations of HLA alleles with HBV clearance or persistence in adults. Findings are often inconsistent, reflecting heterogeneity of populations, populations bias, or the study method (high or low resolution); however, a few associations are reproduced (Table 1). Children in Gambia infected by HBV were found more likely to clear the virus spontaneously when carrying the *DRB1\*13* alleles. This association was confirmed for *DRB1\*1302* in the adult population of the study (20). Polymorphic alleles are generally considered to diversify the properties of HLA molecules and drive the T-cell response toward selective HBV antigens (21). Specifically, the *HLA-DR13* allele has been linked to a vigorous T-helper cell (CD4+ T cells) response to the HBV core antigen (22). Studies on vertical HBV transmission have shown higher frequency of the *HLA-DR\*03* and *HLA-DRB1\*07* alleles in pregnant women, who transmitted the virus to their offspring and in newborns with intrauterine infection, respectively (23,24).

## Cytokines and Chemokines

Polymorphisms of cytokine genes and their receptors have been shown to be involved in the susceptibility to HBV infection both in adults and in children. Production of type I interferons (IFNs) with antiviral and immunomodulatory effects is an early response against viral infection. A recent study demonstrated by genome scan that the class II cytokine receptor cluster, which

accommodates type 1 interferon receptors (IFNAR1, IFNAR2) and other cytokine receptors, is a major locus for HBV persistence (25,26). The study of IFNAR1 polymorphisms in Chinese adults, who were mostly vertically infected, revealed associations of the IFNAR1 exon 3 and promoter alleles with the susceptibility to chronic HBV infection (Table 2) (27,28). Viral replication is followed by IFN- $\gamma$  and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  production, which activates the arm of adaptive immunity (19). Pravica et al (29,30) showed that a variable length dinucleotide (CA) repeat sequence in the human *IFN- $\gamma$*  gene alters the IFN- $\gamma$  in vitro production, and that a T to A SNP (+874A/T), being in linkage with the (CA)<sub>12</sub> repeat region, influences the export of interferon product. Adults with the *I2-IFN- $\gamma$ CA* genotype were more likely to develop immunity to HBV, whereas those carrying 1 or 2 copies of +874A mutant allele were more prone to HBV infection than controls (31). In vertical infection after immunoprophylaxis, immune subjects were more likely carriers of the CA repeat microsatellite variant, whereas infected subjects were more frequently carriers of the *IFN- $\gamma$  + 874AA* genotype (32,33). The TNF- $\alpha$  gene *G/A* polymorphisms at the position –308 and –238 of the promoter region were demonstrated to influence TNF- $\alpha$  expression. The carriage of the low producer TNF- $\alpha$  –308G and –238G alleles was associated with either higher risk of persistent HBV infection or unfavorable prognosis of chronic HB in adults (34–36). In infants born to HBV-positive mothers, the study of commonly polymorphic genes including TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-10 genes revealed that the TNF- $\alpha$  –238A allele may confer a susceptibility to intrauterine infection, whereas the IL-10 –1082G allele may have a protective role, indicating that there is a different regulation of TNF- $\alpha$  gene in newborns and adults (37,38).

Chemokines act as chemoattractants for T cells that are recruited to the liver. RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted) is a high-affinity ligand for CC chemokine receptor 5 (CCR5). The study of RANTES-CCR5–promoter variants in infected Korean adults revealed that *CCR5 –59029G* allele enhances the likelihood of HBV elimination (39). This association could also be important for MTCT because the majority of the Korean population is infected in early infancy (27). CCR5 also seems to be important in other perinatally acquired infections; for example, HIV infection, in which mutations of the *CCR5* gene abolishing molecular expression of *CCR5*, a coreceptor of the macrophage-tropic R5-HIV strains, serve as protection against HIV (40).

## Modulatory Factors of Immune Response

The active form of vitamin D, 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> activates monocytes and T<sub>H</sub>2 cells, inhibits T<sub>H</sub>1 cells, and regulates interferons, cytokines, and chemokines. Vitamin D receptor gene *TaqI* and *FokI* polymorphisms seem to affect HBV infection outcome and HBV familial aggregation. *T-C* (*TaqI-FokI*) haplotype was more common in families with chronic HBV than in healthy control families in a Chinese study, and this association was found to be independent of confounding effects as the influence of sex (41,42). Cyclin D2s (CCND2s) have recently been shown to act as distinct immunomodulatory factors, implicated in cell cycle regulation and altering the proliferation of T and B lymphocytes. Park et al (43) showed significant association between the C allele in the *CCND2-171T4C* SNP and the *CCND2*-haplotype 1 [*T-C-T-A-T*] in the 5'UTR of *CCND2* gene with HBV clearance in a large cohort, characterized by its high prevalence of perinatal HBV infection.

Males are approximately twice as likely to progress to chronic infection as females, and evidence of sex association with the outcome of HBV infection is also provided by animal studies

(44). The identification of the *29T/T* genotype of estrogen receptor 1 (ESR1) in a large sample of Chinese adults suggested that the defect in the immune response to HBV may be attributed to the unresponsiveness of the immune system to sex hormones. In an effort to study transmission disequilibrium, *ESR1* gene was genotyped in nuclear families. The association was reproduced when all of the families were considered; however, after distinguishing the families with HBsAg-positive and -negative mothers, the results in both groups were nonsignificant. This negative finding in families of vertical transmission could be attributed to the reduced sample of families after stratification or could indicate reduced utility of the *29T* allele as a susceptibility marker in MTCT (45).

## Genes Implicated in Protection From Immunization

Vaccination is a simplification of immune response to infections and its study can contribute to the understanding of HBV immunopathogenesis. Hohler et al (46) observed prospectively 202 monozygotic and dizygotic twin pairs, vaccinated with the recombinant HBsAg vaccine, and estimated that 60% of the phenotypic response can be attributed to heritability and 40% to environmental effect. Candidate gene combinations were shown to result in the lack of response, delayed response, or high response to immunization (47). In infants, the range of implicated genetic factors is larger as compared with older, immunologically more mature individuals. Both antibody- and cell-mediated responses are affected by markers within and outside the HLA locus. Consistent evidence about HLA markers associated with responder phenotypes points to *DRB1\*01*, *DRB1\*0301*, *DRB1\*11*, and *DRB1\*15* alleles (46,48). The nonresponder phenotypes have been correlated with *DRB1\*07*, *DQB1\*02* alleles (48,49). The determination of response to vaccination by the HLA type II markers has been attributed to the DR- $\beta$  chain component of HLA-DR molecule, which has been shown to bind a major immunodominant peptide in HBsAg (50). The complement variant *C4AQ0*, located in HLA class III region, has been suggested as “the hottest point” of conditioning faulty response to HBV vaccine, highlighting the significance of the complement in humoral response (48). Regarding non-HLA genes, mitogen-activated protein kinase 8, a kinase of the Toll-like receptors pathway, IFN- $\gamma$ , and IL-10 receptors’ variations play a role in HBV vaccine-induced immunity via affecting the peak anti-HBs level (51). Furthermore, vaccination studies in adolescents have strongly related optimal and suboptimal response to genetic variations of T<sub>H</sub>2 (IL-4) and T<sub>H</sub>1 (IL-12B) cytokines, respectively (52).

Breast-feeding seems to be a considerable nongenetic immunomodulator, contributing to the response to vaccination for HBV, probably through the enhancement of the immature B cells and the distribution of immunoglobulin G subclasses (53). Furthermore, the study outcome of 47 children with HBV chronic infection and their

naïve siblings showed that breast-feeding was related to 17 times greater potentiality to virus clearance than formula feeding (54). Underlying diseases, interacting with diverse immunological pathways, may also influence the response to vaccination in later years. Nemes et al (55) showed that adequately treated children with coeliac disease have a better vaccine response than their noncompliant or undiagnosed matches, pointing to an interaction of gluten intake with humoral immune response in a different way than the HLA DQ antigens. Poor response to HBV vaccine could thus serve as a diagnostic marker for coeliac disease, and nonresponding patients would benefit from revaccination during a gluten-free diet (55).

## Clinical Implications

The susceptibility of infants to HBV is principally attributed to their immunological immaturity. In addition, viral antigens may cross the placental barrier and induce deletion of HBV-specific T cells, resulting in immune tolerance to HBV (56,57). The studies linking host genes with immune response may provide a better understanding of HBV infection pathogenesis early in life. Genetic markers may facilitate the estimation of long-term outcome and the identification of individuals at greater risk for HBV acquisition and poor outcome, therefore requiring closer observation. Genetic studies will contribute further to the development of preventive strategies against primary HBV infection. Recently developed “vaccinomics” promises to facilitate the development of personalized vaccines based on individual response. In particular for hepatitis B, a novel vaccine consisting of a peptide “cocktail” of epitopes and cytokine adjuvants such as granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, may bypass unresponsiveness (58). Given that the available regimens against HBV are limited, understanding genetic susceptibility may introduce new potential supplementation therapies and facilitate the progress toward the goal of curing, not simply treating hepatitis B (Table 2).

## Future Prospects

To date, genetic studies in pediatric and adult populations often result in inconsistent findings that could be attributed to different modulator mechanisms in the distinct age groups, to the population sizes, or to existing linkages between targeted genes that cause a particular allelic combination to be presented more often than is expected by chance. Genomewide association studies are a powerful approach to identify genes involved in a disease phenotype (10). Indeed, novel variations in the *IL28B* gene-coding region of interferon- $\lambda$  were shown by genomewide association studies to be the strongest genomewide determinants of the natural and treatment-induced clearance of hepatitis C virus, and therefore promising tools for the management of viral hepatitis infections

TABLE 3. Recent advances and future prospects

### Innovatory clinical implications

Use of genetic markers for identification of individuals being at greater risk for HBV acquisition and poor outcome and therefore in need of close monitoring

Development of personalized vaccines and/or optimal number of doses based on genotype-phenotype observations

Therapeutic targeting of deficient gene products involved in HBV control and in vaccine response; manipulation of cytokines

### Future research

Genome-wide association and global multicohort studies integrating genetic and clinical data of large populations

Rapid genotyping methods (microarray technology) and advances in bioinformatics

Functional characterization and expression of genetic markers

(59,60). Following genetic markers identification, their functional characterization validates the genetic association, eliminates the risk of methodological discrepancies, and is necessary to ascertain the involvement of the genetic variant in gene regulation and of the gene product in disease pathways. The elucidation of HBV immunogenetics requires global multicohort future trials involving multiple variants and haplotypes rather than isolated genetic markers, integrating the genetic and clinical data (56). Given the importance of detecting HBV infection early in life, more studies focusing on vertical and perinatal transmission are required. The huge availability of SNPs and the recent advances in bioinformatics, microarray technology, and site-directed mutagenesis will facilitate future studies and raise hopes for the emergence of automated, rapid, and affordable tools in the diagnostics and management of hepatitis B (Table 3).

## REFERENCES

- Lavanchy D. Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention. *J Clin Virol* 2006;34:S1–3.
- European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2009;50:227–42.
- World Health Organization. Hepatitis B. <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsrlyo20022/en/>. Accessed November 4, 2010.
- Hann HW, Kim CY, London T, et al. Hepatitis B virus and primary hepatocellular carcinoma: family studies in Korea. *Int J Cancer* 1982;30:47–51.
- Lin TM, Chen CJ, Wu MM, et al. Hepatitis B virus markers in Chinese twins. *Anticancer Res* 1989;9:737–41.
- Tong MJ, Weiner JM, Ashcavai MW, et al. A comparative study of hepatitis B viral markers in the family members of Asian and non-Asian patients with hepatitis B surface antigen-positive hepatocellular carcinoma and with chronic hepatitis B infection. *J Infect Dis* 1979;140:506–12.
- Ying LH, Ying RZ, Shu LZ, et al. Host susceptibility to persistent hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2006;12:4788–93.
- Demir G, Belentepe S, Ozguroglu M, et al. Simultaneous presentation of hepatocellular carcinoma in identical twin brothers. *Med Oncol* 2002;19:113–6.
- Lin J, Liu KY. Linkage and association analyses of microsatellites and single-nucleotide polymorphisms in nuclear families. *BMC Genet* 2005;6 (S25):1–5.
- Hirschhorn JN, Daly MJ. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet* 2005;6:95–108.
- Koch A, Melbye M, Sørensen P, et al. Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. *JAMA* 2001;285:1316–21.
- Boniotto M, Crovella S, Pirulli D, et al. MBL2 polymorphisms are involved in HIV-1 infection in Brazilian perinatally infected children. *AIDS* 2003;17:779–80.
- Hibberd ML, Sumiya M, Summerfield JA, et al. Association of variants of the gene for mannose-binding lectin with susceptibility to meningococcal disease. Meningococcal Research Group. *Lancet* 1999;353:1049–53.
- Chong WP, To YF, Ip WK, et al. Mannose binding lectin in hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2005;42:1037–45.
- Fraser D, Bohlsou A, Jasinskiene N, et al. C1q and MBL, components of the innate immune system, influence monocyte cytokine expression. *J Leukoc Biol* 2006;80:107–16.
- Brown K, Ryder S, Irving W, et al. Mannan binding lectin and viral hepatitis. *Immunol Lett* 2006;108:34–44.
- Bevilacqua E, Fabris A, Floreano P, et al. Genetic factors in mother-to-child transmission of HCV infection. *Virology* 2009;390:64–70.
- Safioleas M, Lygidakis NJ, Manti C. Hepatitis B today. *Hepatogastroenterology* 2007;54:545–8.
- Chang J, Lewin S. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *Immunol Cell Biol* 2007;85:16–23.
- Thursz MR, Kwiatkowski D, Allsopp CE, et al. Association between an MHC class II allele and clearance of hepatitis B virus in the Gambia. *N Engl J Med* 1995;332:1065–9.
- Martin MP, Carrington M. Immunogenetics of viral infections. *Curr Opin Immunol* 2005;17:510–6.
- Singh R, Kaul R, Kaul A, et al. A comparative review of HLA associations with hepatitis B and C viral infections across global populations. *World J Gastroenterol* 2007;13:1770–87.
- Liu HY, Kong BH, Luo X, et al. Study on the association between maternal-infantile vertical transmission of hepatitis B virus and human leukocyte antigen DR gene domain [abstract]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2003;38:599–603.
- Xu YY, Yu J, Zhong Y, et al. Association between the frequency of class II HLA antigens and the susceptibility to intrauterine infection of hepatitis B virus. *Int J Biol Sci* 2008;4:111–5.
- Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 2004;202:8–32.
- Frodsham AJ, Zhang L, Dumpis U, et al. Class II cytokine receptor gene cluster is a major locus for hepatitis B persistence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:9148–53.
- Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997;337:1733–45.
- Zhou J, Smith DK, Lu L, et al. A non-synonymous single nucleotide polymorphism in IFNAR1 affects susceptibility to chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* 2009;16:45–52.
- Pravica V, Asderakis A, Perrey C, et al. In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. *Eur J Immunogenet* 1999;26:1–3.
- Pravica V, Perrey C, Stevens A, et al. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum Immunol* 2000;61:863–6.
- Abbott W, Gane E, Winship I, et al. Polymorphism in intron 1 of the interferon-gamma gene influences both serum immunoglobulin E levels and the risk for chronic hepatitis B virus infection in Polynesians. *Immunogenetics* 2007;59:187–95.
- Yu H, Zhu QR, Gu SQ, et al. Association of interferon-gamma +874 gene single nucleotide polymorphism with susceptibility to intrauterine HBV infection [abstract]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2004;42:421–3.
- Yu H, Zhu QR, Gu SQ, et al. Relationship between IFN-gamma gene polymorphism and susceptibility to intrauterine HBV infection. *World J Gastroenterol* 2006;12:2928–31.
- Cheong JY, Cho SW, Hwang IL, et al. Association between chronic hepatitis B virus infection and interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphisms. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;7:1163–9.
- Niro GA, Fontana R, Gioffreda D, et al. Tumor necrosis factor gene polymorphisms and clearance or progression of hepatitis B virus infection. *Liver Int* 2005;25:1175–81.
- Du T, Guo XH, Zhu XL, et al. Association of TNF-alpha promoter polymorphisms with the outcomes of hepatitis B virus infection in Chinese Han population. *J Viral Hepat* 2006;9:618–24.
- Gu SQ, Zhu QR, Yu H, et al. Relationship between genetic polymorphism of tumor necrosis factor-alpha and susceptibility to intrauterine HBV infection [abstract]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2004;12:538–9.
- Zhu QR, Ge YL, Gu SQ, et al. Relationship between cytokines gene polymorphism and susceptibility to hepatitis B virus intrauterine infection. *Chin Med J* 2005;118:1604–9.
- Ahn SH, Kim DY, Chang HY, et al. Association of genetic variations in CCR5 and its ligand, RANTES with clearance of hepatitis B virus in Korea. *J Med Virol* 2006;78:1564–71.
- Pedersen B, Kamwendo D, Blood M, et al. CCR5 haplotypes and mother-to-child HIV transmission in Malawi. *PLoS One* 2007;2:e838.
- Liu M, Cao B, Zhang H, et al. Association of interferon-gamma gene haplotype in the Chinese population with hepatitis B virus infection. *Immunogenetics* 2006;58:859–64.
- Shan J, Wang L, Li Z, et al. Relationship between polymorphisms of vitamin D receptor gene and familial aggregation of HBsAg carriers [abstract]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2006;28:148–53.
- Park TJ, Chun JC, Bae JS. CCND2 polymorphisms associated with clearance of HBV infection. *J Hum Genet* 2010;55:416–20.
- Craxi A, Montano L, Goodall A, et al. Genetic and sex-linked factors influencing HBs antigen clearance: non-immune clearance in inbred strains of mice. *J Med Virol* 1982;9:117–21.

45. Deng G, Zhou G, Zhai Y, et al. Association of estrogen receptor polymorphisms with susceptibility to chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2004;40:318–26.
46. Hohler T, Reuss E, Evers N, et al. Differential genetic determination of immune responsiveness to hepatitis B surface antigen and to hepatitis A virus: a vaccination study in twins. *Lancet* 2002;360:991–5.
47. Kimman TG, Vandebriel RJ, Hoebee B. Genetic variation in the response to vaccination. *Community Genet* 2007;10:201–17.
48. Martinetti M, De Silvestri A, Belloni C, et al. Humoral response to recombinant hepatitis B virus vaccine at birth: role of HLA and beyond. *Clin Immunol* 2000;97:234–40.
49. Wang C, Tang J, Song W, et al. HLA and cytokine gene polymorphisms are independently associated with responses to hepatitis B vaccination. *Hepatology* 2004;39:978–88.
50. Deulofeut H, Iglesias A, Mikael N, et al. Cellular recognition and HLA restriction of a midsequence HBsAg peptide in hepatitis B vaccinated individuals. *Mol Immunol* 1993;30:941–8.
51. Hennig BJ, Fielding K, Broxholme J, et al. Host genetic factors and vaccine-induced immunity to hepatitis B virus infection. *PLoS One* 2008;3:e1898.
52. Shirak K. Perinatal transmission of hepatitis B virus and its prevention. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:E11–15.
53. Azzari C, Resti M, Rossi ME, et al. Modulation of human milk of IgG subclass response to hepatitis B vaccine in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1990;10:310–5.
54. Vajro P, Fontanella A. Breast feeding and hepatitis B. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991;12:141.
55. Nemes E, Lefler E, Szegedi L, et al. Gluten intake with the humoral immune response to recombinant hepatitis B vaccine in patients with celiac disease. *Paediatrics* 2008;121:1570–6.
56. Wang FS. Current status and prospects of studies on human genetic alleles associated with hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2003;9:641–4.
57. Li JH, Li HQ, Li Z, et al. Association of Taq I T/C and Fok I C/T polymorphisms of vitamin D receptor gene with outcome of hepatitis B virus infection. [abstract]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2006;86:1952–6.
58. Poland G, Ovsyannikova I, Jacobson R. Personalized vaccines: the emerging field of vaccinomics. *Expert Opin Biol Therapy* 2008;8:1659–67.
59. Thomas D, Thio C, Martin M. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009;461:798–802.
60. Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, et al. Genetic variation in *IL28B* is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: A genome wide association study. *Gastroenterology* 2010;138:1338–45.
61. Caillat-Zucman S, Gimenez JJ, Wambergue F, et al. Distinct HLA class II alleles determine antibody response to vaccination with hepatitis B surface antigen. *Kidney Int* 1998;53:1626–30.
62. Karan MA, Tassioglou NE, Ozturk AO, et al. The role of HLA antigens in chronic hepatitis B virus infection. *J Pak Med Assoc* 2002;52:253–6.
63. Zhu XL, Du T, Li JH, et al. Association of HLA-DQB1 gene polymorphisms with outcome of HBV infection in a Chinese Han population. *Swiss Med Wkly* 2007;137:114–20.
64. Amarapurpar DN, Patel ND, Kankonkar SR. HLA class II genotyping in chronic hepatitis B infection. *J Assoc Phys India* 2003;51:779–81.
65. Ahn SH, Han KH, Park JY, et al. Association between hepatitis B virus infection and HLA-DR type in Korea. *Hepatology* 2000;31:1371–3.
66. Cotrina M, Buti M, Jardi R, et al. Study of HLA-II antigens in chronic hepatitis C and B and in acute hepatitis B. *Gastroenterol Hepatol* 1997;20:115–8.
67. Hohler T, Gerken G, Notghi A, et al. HLA-DRB1\*1301 and \*1302 protect against chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1997;26:503–7.
68. Diepolder HM, Jung MC, Keller E, et al. A vigorous virus-specific CD4+ T cell response may contribute to the association of HLA-DR13 with viral clearance in hepatitis B. *Clin Exp Immunol* 1998;113:244–51.
69. Desombere I, Willems A, Leroux-Roels G. Response to hepatitis B vaccine: multiple HLA genes are involved. *Tissue Antigens* 1998;51:593–604.
70. Popov EA, Levitan BN, Alekseev LP, et al. Immunogenetic HLA markers of chronic viral hepatitis. *Ter Arkh* 2005;77:54–9.
71. Thio CL, Thomas DL, Karacki P, et al. Comprehensive analysis of class I and class II HLA antigens and chronic hepatitis B virus infection. *J Virol* 2003;77:12083–7.



# Genetic variants associated with susceptibility to mother-to-child transmission of hepatitis B virus

Virginia Chatzidaki<sup>a</sup>, Despoina Choumerianou<sup>a</sup>, Helen Dimitriou<sup>a</sup>, Elias Kouroumalis<sup>b</sup> and Emmanouil Galanakis<sup>a</sup>

**Objective** The mechanisms of immune tolerance to hepatitis B virus (HBV) in children infected perinatally or early in infancy still remain unclarified. We aimed to study the genetic variants of immune factors implicated in viral-host interaction in children who were born to HBV-positive mothers and who had different clinical outcome.

**Methods** Mannose-binding lectin gene (*mbi2*) codon 54, codon 57, and promoter 221 variants, tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 308G/A, and vitamin D receptor (VDR) *Apal* and *TaqI* genotypes were analyzed in three groups of children born to HBV-positive mothers: children with chronic infection ( $n=33$ ), those with resolved infection ( $n=36$ ), and those naive for HBV ( $n=33$ ).

**Results** TNF- $\alpha$  - 308G allele frequency was found to be increased in children with chronic infection compared with children who were not affected by HBV [risk ratio (RR) 1.12, 95% confidence interval (CI) 1.0–1.25;  $P=0.050$ ]. The VDR *Apal* A allele tended to be more frequent in children with chronic infection than in those with resolved HBV infection

(RR 1.27, 95% CI 0.95–1.67;  $P=0.071$ ). The VDR *Apal*  $\alpha$  allele in *Apal* and *TaqI* joint haplotype  $\alpha T$  was more frequent in children with resolved infection than in those with chronic infection (RR 1.74, 95% CI 0.97–3.13;  $P=0.049$ ).

**Conclusion** Our results suggest that TNF- $\alpha$  and vitamin D pathways may be involved in the susceptibility to and outcome of HBV infection acquired early in life. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 00:000–000 © 2012 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

European Journal of Gastroenterology & Hepatology 2012, 00:000–000

**Keywords:** hepatitis B, mannose-binding lectin, mother-to-child transmission, polymorphism, tumor necrosis factor  $\alpha$ , vitamin D receptor

Departments of <sup>a</sup>Paediatrics and <sup>b</sup>Gastroenterology, University of Crete, Heraklion, Greece

Correspondence to Emmanouil Galanakis, MD, PhD, Department of Paediatrics, University of Crete, PO Box 2208, 71306 Heraklion, Greece  
Tel: +30 281 039 2012; fax: +30 281 039 2827;  
e-mail: emmgalan@med.uoc.gr

Received 14 March 2012 Accepted 19 May 2012

## Introduction

The susceptibility of newborns and infants to chronic hepatitis B virus (HBV) infection is underpinned by their immature adaptive immune response [1]. Their innate immune system contributes to early viral control, but may also invoke the long-term immune tolerance to HBV.

Mannose-binding lectin (MBL) is an innate immunity factor known to activate the complement after binding to HBV surface glycoproteins and to elicit viral opsonization [2]. Variants in the *mbi2* gene, including the single-point mutations in exon 1 (codons 54 and 57) and at position 221 of the promoter, reduce plasma MBL levels [3]. MBL deficiency has been related to increased susceptibility to infection in infants [4] and to poor outcome from hepatitis B and C infection in adults [5–7]. Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) is also an efficient factor of HBV clearance, able to disrupt viral particles, transcriptional templates, and episomal covalently closed circular DNA [8,9]. Plasma TNF- $\alpha$  levels are modified by a variant at position -308 of its gene [10]. Vitamin D affects viral presentation by suppressing antigen presentation and effector T-cell activation in a vitamin D receptor (VDR) transcription-dependent manner [11,12]. Low levels of viral antigens, expressed by antigen-presenting cells, are unable to induce the CD4 T cells

but are sufficient to activate cytotoxic T cells, which mediate liver injury without clearing HBV [1]. Two variants in the VDR gene, *Apal* *A/a* at intron 8 and *TaqI* *T/t* at exon 9, have already been related to the outcome of hepatitis B in adults [13,14].

In this study, we aimed to investigate the effect of the *mbi2*, TNF- $\alpha$ , and VDR gene variants on the acquisition of HBV infection and the progress to chronicity or clearance, and thus on the outcome of children born to HBV-positive mothers.

## Methods

### Patients

This retrospective study included 102 children and adolescents (53 boys, 49 girls) aged 0.5–18.5 (mean 9.17) years, born to HBV-positive mothers and belonging to nomadic families with generally poor compliance to the national vaccination program that suggests administration of HBV-specific immunoglobulin and full immunization for HBV. The enrollment took place in the years 2006–2008 and the children were born between 1989 and 2006. The frequent change of residence of nomadic families often posed a barrier for the effective follow-up in pregnancy and the early administration of the vaccination schedule in the children under study, several

of whom were born before the implementation of the national vaccination program, which has changed the epidemiology of hepatitis B nationwide [15].

The children were assessed for HBV serology, and those found to be hepatitis B surface antigen (HBsAg) positive were retested later for potential HBsAg seroconversion. None of the children were suffering from other concomitant diseases that could affect their immune or liver function, and none of the children with HBsAg positivity had received treatment. The study was approved by the institutional committee of the Medical School, University of Crete, and informed consent was obtained from parents and older children.

### Definitions

Chronic infection was defined as the presence of HBsAg for more than 6 months, and resolution of infection was defined as the disappearance of HBsAg and the development of anti-HBs antibodies. Children with isolated anti-HBc positivity were not included in this study, as this serology could indicate not only chronic HBV infection but also resolved infection with false-negative anti-HBs results [16]. Mothers were defined as HBV positive on the basis of their serologic profile rather than on the basis of their viral load at the time of study enrollment. On the basis of the aforementioned criteria, the group of children with chronic HBV infection consisted of 33 HBsAg-positive children (14 boys and 19 girls) aged 3.0–18.5 (mean 11.4) years. The group with spontaneous HBV clearance consisted of 36 children (17 boys and 19 girls) aged 0.5–18 (mean 9.47) years and the group of naive children consisted of 33 children (22 boys and 11 women) aged 1.0 to 14 (mean 6.58) years.

### DNA extraction and PCR-RFLP analysis

Whole blood was collected in EDTA tubes, and genomic DNA was isolated from leukocytes using a commercial kit (DNA Purification Kit, Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA). The cDNA of the human *mb12*, TNF- $\alpha$ , and VDR sequence existing in GenBank was used for the design of primers (Table 1). Polymorphisms *mb12* 'B' allele at exon 1 codon 54 (GGG to GAC, accession ss3344470), 'C' allele at exon 1 codon 57 (GGA to GAA, accession ss48295540), and 'X' allele at the 221 position of the promoter region (G to C substitution, accession ss38540952); the TNF- $\alpha$  -308 promoter variation (A to G, accession ss12691494); and VDR *Apal* (G to T) and *TaqI* (T to C) markers in intron 8 and exon 9, accessions ss78577228 and ss76497, respectively, were analyzed by PCR in a PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research, Lincoln Street Waltham, Massachusetts, USA), followed by digestion of products with restriction endonucleases. VDR gene alleles were designated using the existing nomenclature [12]; thus, presence of the restriction site was indicated by the lowercase allele (*a* and *t*) and absence of the uppercase allele (*A* and *T*).

For *mb12* exon 1 analysis, the reaction contained 100 ng of template genomic DNA, 0.24  $\mu$ mol/l each of forward and reverse primers, 0.2 mmol/l of deoxynucleotides (dNTPs), 1  $\times$  reaction buffer (Invitrogen, Mainway Burlington, Ontario, Canada), 1.5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, and 0.5 U DNA Taq Polymerase (Invitrogen). After an initial heating at 94°C for 5 min, 32 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 61°C for 30 s, extension at 72°C for 30 s, and a final elongation at 72°C for 10 min, the PCR products were digested by *BanI* and *MboII* (New England Biolabs, County Road Ipswich, Massachusetts, USA) restriction endonucleases. In the digestion of exon 1 fragment, 4  $\mu$ l of PCR product was incubated with 2.5 U of *BanI* and *MboII* at 37°C overnight in two single digestions, and the products were visualized in 3% agarose gels in 1  $\times$  TBE buffer. When the mutant alleles at codons 54 and 57 were present, the restriction resulted in two fragments of 245 and 84 bp and 254 and 75 bp, respectively. Amplification of the fragment with the *mb12* promoter polymorphism at position -221 was performed by an initial heating at 94°C for 5 min, followed by 37 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 56°C for 30 s, extension at 72°C for 30 s, and a final elongation at 72°C for 5 min. The PCR product was digested by *BtgI* restriction endonuclease (New England Biolabs). Digestion was performed by incubation of 4  $\mu$ l of PCR product with 3 U of *BtgI* at 37°C overnight. The presence of the X variant created the restriction site and resulted in two fragments of 122 and 59 bp, visualized in 2.5% agarose gels. MBL serum levels were determined in 28, 32, and 16 children with HBV chronic infection, clearance, and naivity, respectively, by indirect enzyme-linked immunosorbent assay according to the manufacturer's instructions (Hy-Cult, Urden, The Netherlands) and our experience [7]. MBL levels less than 500 ng/ml were defined as low and those more than or equal to 500 ng/ml were defined as normal [4].

For TNF- $\alpha$  -308G/A single-nucleotide polymorphism, 0.24  $\mu$ mol/l of each forward and reverse primer was mixed with 0.2 mmol/l of dNTPs, 1  $\times$  reaction buffer (Invitrogen), 1.5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U of DNA Taq Polymerase (Invitrogen), and 100 ng of template genomic DNA at a final volume of 12.5  $\mu$ l. After an initial heating at 95°C for 3 min, 33 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 57°C for 30 s, extension at 72°C for 45 s, and a final elongation at 72°C for 5 min, 5  $\mu$ l of the 108 bp PCR product was digested by 3 U of *NcoI* restriction endonuclease (New England Biolabs) at 37°C overnight. The digestion products (108 bp in the presence of A and 83 and 25 bp in the presence of G) were visualized in 4% agarose gels in 1  $\times$  TBE buffer under ultraviolet light with ethidium bromide staining.

VDR *Apal* and *TaqI* polymorphisms were analyzed using the same primer pairs in two single digestions. The 740-bp PCR product of the VDR gene containing the two

**Table 1** Polymerase chain reaction primers designed to amplify fragments harboring the *mbi2*, TNF- $\alpha$  -308, and VDR *Apal* and *TaqI* SNPs

SNPs; base substitutions	Primer	Product size (bp)
Cdn54(B)	Forward (5'-3') GTAGGACAGAGGGCATGCTC	329 (uncleaved)
G>A; rs1800450	Reverse (5'-3') CAGGCAGTTTCTCTGGAAGG	245 and 84 (cleaved)
Cdn57(C)	Forward (5'-3') GTAGGACAGAGGGCATGCTC	329 (uncleaved)
G>A; rs1800451	Reverse (5'-3') CAGGCAGTTTCTCTGGAAGG	254 and 75 (cleaved)
-221X/Y	Forward (5'-3') CCGAAGAGGACATGGAGAGA	181 (uncleaved)
G>C; rs7096206	Reverse (5'-3') TCATCTGTGCCTAGACACCTG	122 and 59 (cleaved)
TNF- $\alpha$ -308	Forward (5'-3') AGGCAATAGGTTTGGAGGCCAT	108 (uncleaved)
A>G; rs3091256	Reverse (5'-3') TCCTCCCTGCTCCGATTCCG	83 and 25
VDR <i>Apal</i>	Forward (5'-3') CAGAGCATGGACAGGGAGCAA	740 (uncleaved)
G>T; rs7975232	Reverse (5'-3') GCAACTCCTCATGGCTGAGGTC	530 and 210
VDR <i>TaqI</i>	Forward (5'-3') CAGAGCATGGACAGGGAGCAA	740 (uncleaved)
T>C; rs731236	Reverse (5'-3') GCAACTCCTCATGGCTGAGGTC	245, 290, 205 or 245, 495

*mbi2*, mannose-binding lectin gene; SNPs, single-nucleotide polymorphisms; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ ; VDR, vitamin D receptor.

sites was obtained by PCR amplification by initial heating at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation (at 94°C for 30 s), annealing (at 70°C for 30 s), and chain extension (at 72°C for 45 s) and a subsequent final extension step at 72°C for 5 min. A total volume of 12.5  $\mu$ l contained 100 ng of genomic DNA, 0.24  $\mu$ mol/l of each primer, 0.2 mmol/l of each dNTP, 1.5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, standard PCR buffer, and 0.5 U Taq Polymerase (Invitrogen). The product was digested overnight with 3 U of *Apal* restriction endonuclease (Promega Corporation) at 37°C, and the products were separated on 1.5% agarose gel. The presence of *T* allele or the *Apal* restriction site resulted in 210- and 530-bp fragments and absence resulted in a 740-bp unrestricted fragment. The PCR product was also digested with 3 U of *TaqI* restriction endonuclease (Promega Corporation) for 3 h at 65°C in three fragments of 245, 290, and 205 bp (restriction site present, *C* allele) and in two fragments of 245 and 495 bp (restriction site absent, *T* allele), visualized using 3.5% agarose gel.

### Statistical analysis

The prevalence of mutations was assessed by the Hardy-Weinberg equilibrium. The differences in allele, genotype, haplotype frequencies, and MBL levels were calculated with one-tailed Fisher's exact probability test and risk ratios (RRs), and 95% confidence intervals (CIs) were calculated. *P* values less than 0.05 were defined as significant. The statistical analysis was performed using SPSS software version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

### Results

Female children were at higher risk of acquiring HBV infection compared with male children (77.6 vs. 58.5%; *P* = 0.032; RR = 1.33, CI 1.00–1.74); however, the risk of progressing to chronicity was the same (50.0 vs. 45.2%; *P* = 0.44).

### MBL polymorphisms

The prevalence of mutant alleles in codons 54 and 57 and at position -221 and the distribution of *mbi2* haplotypes

did not differ among the study groups (Table 2). Low serum MBL values were found in 13.2% of the whole cohort, in 10.7% of children with chronic infection, in 15.6% of children with HBV clearance, and in 12.5% of HBV-naive participants; no significant differences were observed among the three groups of children.

### TNF- $\alpha$ -308 polymorphism

TNF- $\alpha$  -308G allele (Table 3) was found more frequently in children with chronic infection than in HBV-naive children (95.5 vs. 85.5%; RR = 1.12, 95% CI 1.0–1.25; *P* = 0.050) and in infected than in noninfected children, although not at a significant level (92.8 vs. 85.5%; RR = 1.09, 95% CI 0.97–1.21; *P* = 0.089).

### VDR *Apal* and *TaqI* polymorphisms

VDR *Apal* *A* allele (as compared with *a* allele, Table 4) was more frequent, although at a marginal level of significance, in children with chronic than in children with resolved infection (65.21 vs. 51.4%; RR = 1.27, 95% CI 0.95–1.67; *P* = 0.071). In contrast, the VDR *Apal*  $\alpha$  allele in VDR *Apal* and *TaqI* joint haplotype  $\alpha T$  (as compared with *At* and *AT* haplotypes) was more frequent in children with resolved infection than in children with chronic infection (47.4 vs. 27.3%; RR = 1.74, 95% CI 0.97–3.13; *P* = 0.049). *TaqI* and *Apal* markers were found to be in linkage disequilibrium, consistent with the findings of previous studies [17]. Three joint genotypes (*AAtt*, *AaTt*, and *aaTT*) were more common, exhibiting frequencies of 22.5, 39.2, and 17.6%, compared with the less common genotypes *AATt*, *AATT*, and *AaTT* (9.8, 2.9, and 7.8%, respectively).

### Discussion

Our understanding of mother-to-infant HBV transmission is slowly expanding as a result of recent association studies involving genetic variants such as *HLA-DRB1\*07*, TNF- $\alpha$  238A, and interferon  $\gamma$  874A in cases of intrauterine infection [18–20] and studies on antigen-specific T-cell immune responses [21,22]. Our findings indicate a potential link between the outcome of early



**Table 2 Distribution of mannose-binding lectin exon 1 and promoter genotype and haplotype frequencies in 102 children born to HBV-infected mothers (33 with chronic HBV infection, 36 with spontaneous clearance of HBsAg, and 33 HBV naïve children)**

<i>mbi2</i> SNP	N (%)			Total	HWE <sup>a</sup> , <i>P</i> value
	HBsAg persistence	HBsAg clearance	HBV naivity (%)		
<b>Codon 54</b>					
Genotype					
AA	0 (0.0)	1 (2.8)	0 (0.0)	1 (1.0)	0.49 (0.70)
GA	7 (21.2)	6 (16.7)	6 (18.2)	19 (18.6)	
GG	26 (78.8)	29 (80.6)	27 (81.8)	82 (80.4)	
Alleles					
A	7 (10.6)	8 (11.1)	6 (9.1)	21 (10.3)	
G	59 (89.4)	64 (88.9)	60 (90.9)	183 (89.7)	
<b>Codon 57</b>					
Genotype					
AA	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.93 (0.90)
GA	1 (3.0)	0 (0.0)	2 (6.1)	3 (2.9)	
GG	32 (97.0)	36 (100.0)	31 (93.9)	99 (97.1)	
Alleles					
A	1 (1.5)	0 (0.0)	2 (3.0)	3 (1.5)	
G	65 (98.5)	72 (100)	64 (97.0)	201 (98.5)	
<b>Promoter 221</b>					
Genotype					
XX	2 (6.1)	2 (5.6)	5 (15.6)	9 (8.8)	0.77 (0.05)
XY	11 (33.3)	13 (36.1)	6 (18.8)	30 (29.4)	
YY	20 (60.6)	21 (58.3)	21 (65.6)	62 (60.8)	
Alleles					
X	15 (22.7)	17 (23.6)	16 (25.0)	48 (23.8)	
Y	51 (77.3)	55 (76.4)	48 (75.0)	154 (76.2)	
Haplotypes <sup>b</sup>					
YA/YA	15 (45.5)	18 (50.0)	15 (46.9)	48 (47.5)	
YA/XA	9 (27.3)	11 (30.6)	6 (18.8)	26 (25.7)	
XA/XA	2 (6.1)	0 (0.0)	4 (12.5)	6 (5.9)	
YA/O <sup>c</sup>	4 (12.1)	2 (5.6)	5 (15.6)	11 (10.9)	
XA/O	2 (6.1)	4 (11.1)	1 (3.1)	7 (6.9)	
O/O	1 (3.0)	1 (2.8)	1 (3.1)	3 (3.0)	

HBsAg, hepatitis B surface antigen; HBV, hepatitis B virus; HWE, Hardy–Weinberg equilibrium; *mbi2*, mannose-binding lectin gene; SNP, single-nucleotide polymorphism.

<sup>a</sup>Hardy–Weinberg equilibrium; *P* values for patients (values for controls in parentheses).

<sup>b</sup>Grouping of haplotypes YA/YA, YA/XA, XA/XA vs. YA/O, XA/O, O/O.

<sup>c</sup>O represents the mutant allele in codon 54 or 57 of *mbi2* exon 1. In the presence of O, the promoter allele on the functional A haplotype was not considered [3,5].

**Table 3 Distribution of TNF- $\alpha$  –308 genotype and haplotype frequencies in 102 children born to HBV-infected mothers (33 with chronic HBV infection, 36 with spontaneous clearance of HBsAg, and 33 HBV- naïve children)**

Polymorphisms	HBsAg persistence (%)	HBsAg clearance (%)	HBV naivity (%)	Total	HWE <sup>a</sup> , <i>P</i> value
<b>308G/A</b>					
Genotype					
AA	0 (0.0)	2 (5.6)	3 (9.7)	5 (4.9)	0.78 (0)
GA	3 (9.1)	3 (8.3)	3 (9.7)	9 (8.8)	
GG	30 (90.9)	31 (86.1)	25 (80.6)	86 (84.3)	
Alleles					
A	3 (4.5)	7 (9.7)	9 (14.5)	19 (9.5)	
G	63 (95.5)	65 (90.3)	53 (85.5)	181 (90.5)	

HBsAg, hepatitis B surface antigen; HBV, hepatitis B virus; HWE, Hardy–Weinberg equilibrium; TNF- $\alpha$ ; tumor necrosis factor  $\alpha$ .

<sup>a</sup>Hardy–Weinberg equilibrium; *P* values for patients (values for controls in parentheses).

HBV infection and TNF- $\alpha$  and possibly VDR, but not MBL pathways.

MBL deficiency as defined by *mbi2* genotypes or serum MBL levels appears to have little influence on early HBV infection. Recently, we showed a role of *mbi2* genotypes and serum MBL levels in the progression of hepatitis C virus infection in adults [7], in line with a few studies that had recognized low MBL as a risk factor for HBV progression in adults and high-expressing *mbi2* genotypes as related to spontaneous clearance [2,6]. However, MBL

impact was not confirmed in studies on Asian adults, mostly perinatally infected by HBV [5], and in children vertically infected by hepatitis C virus [23].

TNF- $\alpha$  –308G allele was found to be increased in chronic HBV carriers than in naïve children. Consistent findings were derived from adult studies; the TNF- $\alpha$  –308G allele has been linked to higher risk for HBV persistence [24,25] or progression of liver disease [26], whereas the –308A allele was linked to optimal outcome from HBV infection [9]. TNF- $\alpha$  mediates the noncytolytic viral clearance,

**Table 4** Distribution of VDR genotype and haplotype frequencies in 102 children born to HBV-infected mothers (33 with chronic HBV infection, 36 with spontaneous clearance of HBsAg, and 33 HBV-naive children)

Polymorphisms	HBsAg persistence (%)	HBsAg clearance (%)	HBV naivity (%)	Total	HWE <sup>a</sup> , <i>P</i> value
<i>Apal</i>					
Genotype					
GG (AA)	14 (42.4)	9 (25.0)	13 (39.4)	36 (35.3)	0.99 (0.80)
GT (Aa)	15 (45.5)	19 (52.8)	14 (42.4)	48 (47.1)	
TT (aa)	4 (12.1)	8 (22.2)	6 (18.2)	18 (17.6)	
Allele					
G (A)	43 (65.2)	37 (51.4)	40 (60.6)	120 (58.8)	84 (41.2)
T (a)	23 (34.8)	35 (48.6)	26 (39.4)	84 (41.2)	
<i>TaqI</i>					
Genotype					
TT (TT)	8 (24.2)	11 (30.5)	10 (30.3)	29 (28.4)	0.86 (0.97)
CT (Tt)	16 (48.5)	19 (52.8)	15 (45.5)	50 (49.0)	
CC (tt)	9 (27.3)	6 (16.7)	8 (24.2)	23 (22.5)	
Allele					
T (T)	32 (48.5)	41 (56.9)	35 (53.0)	108 (52.9)	96 (47.1)
C (t)	34 (51.5)	31 (43.1)	31 (47.0)	96 (47.1)	
Joint haplotype <sup>b</sup>					
TT (aT)	12 (27.3)	18 (47.4)	14 (33.3)	44 (35.5)	
GT (AT)	9 (20.4)	6 (15.8)	9 (21.4)	24 (19.3)	
GC (At)	23 (52.3)	14 (36.8)	19 (45.2)	56 (45.2)	
TC (at)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	

HBsAg, hepatitis B surface antigen; HBV, hepatitis B virus; HWE, Hardy–Weinberg equilibrium; VDR, vitamin D receptor.

<sup>a</sup>Hardy–Weinberg equilibrium; *P* values for patients (values for controls in parentheses).

<sup>b</sup>Individuals genotyped heterozygous in both the *TaqI*, *Apal* sites were not considered for haplotype frequency analysis, as the homologous chromosomes could not be unequivocally defined; a carrier of the *Az/Tt* (GTCT) joint genotype harbored *A/T* and *a/t* or *A/t* plus *aT* haplotypes. Children with haplotypes *AAtt* (GGCC), *AAIt* (GGTC), *AATT* (GGTT), *AzTT* (GTTT), and *zzTT* (TTTT) were only considered for the haplotype analysis.

and its alleles are linked to neighboring HLA genes (*HLADRI3*), which also relate to a vigorous immune response toward HBV [9]. Controversially, in HBsAg carrier immunotolerant children, TNF- $\alpha$  production upon stimulation was found to be higher compared with healthy controls, reflective of its additional ability to allow ongoing liver injury [27].

The VDR *Apal* *a* allele seemed to be associated with HBV resolution, and (*Apal*–*TaqI*) *aT* and *At* haplotypes, known to be the most common in Whites [12,28], were linked to viral clearance and persistence, respectively. The *Apal* variant is located in a noncoding region, whereas *TaqI* does not alter the VDR polypeptide. In an Indian study *Apal* *aa* and *at* haplotypes were associated with severe liver disease and higher viral load [13], and in Taiwanese adults the *At* haplotype was associated with frequent hepatic flares and persistent positivity of HBeAg [14]. Although the *TT* genotype has been associated with higher levels of VDR expression compared with those of the *tt* genotype and therefore could be linked to higher VDR expression and better ability of the host cells to use vitamin D [29], the implication of *Apal* and *TaqI* variations for the immune functions is unknown. Vitamin D in early HBV infection might affect the priming of the innate immune response, the suppression of interleukin 12, interferon  $\gamma$  expression, and differentiation of dendritic cells [11,30].

Several limitations should be considered in this study. The retrospective nature of the study did not allow for precise information to be collected on the reasons for poor compliance to the timely immunoprophylaxis in

these children. The cohort was small, but the recruitment of larger groups of perinatally infected children in a nonendemic country is difficult, as newborns born to HBsAg-positive mothers are increasingly treated with immunoglobulin and vaccinated. The study design did not allow for precise data to be collected on maternal HBV serology and viral load during pregnancy and delivery. All the enrolled children were born to HBV-positive mothers and were thus exposed to HBV; however, evidence was limited on the precise timing of exposure or the potential role of horizontal transmission from other infected members of the family. Maternal infection has a crucial role in the vertical/perinatal infection of the infant, but acquisition of HBV during infancy and childhood may be horizontal transmission from other infected members of the family [31].

Despite the progress made in the understanding of early HBV infection, there remains much to explore in the field of host response in this crucial period of life. Our findings suggest that TNF- $\alpha$  and possibly vitamin D pathways may be involved in the progress of early HBV infection; however, no firm conclusions could be drawn and our findings should be treated as preliminary until verified by genotype and phenotype studies in larger cohorts and different populations.

## Acknowledgements

The authors thank children, mothers, and families for their collaboration.

This study was funded through the University of Crete Research Account (ELKE), Project #2464.

## Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

## References

- Carey I, Vergani D. The role of viral-specific immune responses on the outcome of chronic hepatitis B (HBV) infection in children: new insights into immunopathology. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; **45**:15–18.
- Chong WP, To YF, Ip WK, Yuen MF, Poon TP, Wong WH, et al. Mannose-binding lectin in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2005; **42**:1037–1045.
- Madsen HO, Garred P, Thiel S, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, et al. Interplay control between promoter and structural gene variants basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol* 1995; **155**:3013–3020.
- Israëls J, Frakking FN, Kremer LC, Offringa M, Kuijpers TW, van de Wetering MD. Mannose-binding lectin and infection risk in newborns: a systematic review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2010; **95**:F452–F461.
- Thomas HC, Foster GR, Sumiya M, McIntosh D, Jack DL, Turner MW, et al. Mutation of gene of mannose-binding protein associated with chronic hepatitis B viral infection. *Lancet* 1996; **348**:1417–1419.
- Thio CL, Mosbrugger T, Astemborski J, Geer S, Kirk GD, O'Brien SJ, et al. Mannose binding lectin genotypes influence recovery from hepatitis B virus infection. *J Virol* 2005; **79**:9192–9196.
- Koutsounaki E, Goulielmos GN, Koulentaki M, Choulaki C, Kouroumalis E, Galanakis E. Mannose-binding lectin MBL2 gene polymorphisms and outcome of hepatitis C virus-infected patients. *J Clin Immunol* 2008; **28**:495–500.
- Biermer M, Puro R, Schneider R. Tumor necrosis factor alpha inhibition of hepatitis B virus replication involves disruption of capsid integrity through activation of NF- $\kappa$ B. *J Virol* 2003; **77**:4033–4042.
- Kim YJ, Lee HS, Yoon JH, Kim CY, Park MH, Kim LH, et al. Association of TNF-alpha promoter polymorphisms with the clearance of hepatitis B virus infection. *Hum Mol Genet* 2003; **12**:2541–2546.
- Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 1997; **34**:391–399.
- Walker V, Modlin R. The vitamin D connection to pediatric infections and immune function. *Pediatr Res* 2009; **65**:106R–113R.
- Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 2004; **338**:143–156.
- Suneetha PV, Sarin SK, Goyal A, Kumar GT, Shukla DK, Hissar S. Association between vitamin D receptor, CCR5, TNF-alpha and TNF-beta gene polymorphisms and HBV infection and severity of liver disease. *J Hepatol* 2006; **44**:856–863.
- Huang YW, Liao YT, Chen W, Chen CL, Hu JT, Liu CJ, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and distinct clinical phenotypes of hepatitis B carriers in Taiwan. *Genes Immun* 2010; **11**:87–93.
- Zacharakis G, Kotsiou S, Papoutselis M, Vafiadis N, Tzara F, Pouliou E, et al. Changes in the epidemiology of hepatitis B virus infection following the implementation of immunisation programmes in northeastern Greece. *Euro Surveill* 2009; **14** pii:19297.
- Ponde PA, Cardoso DD, Ferro MO. The underlying mechanisms for the 'anti-HBc alone' serological profile. *Arch Virol* 2010; **155**:149–158.
- Fang Y, van Meurs JB, d'Alesio A, Jhamai M, Zhao H, Rivadeneira F, et al. Promoter and 3'-untranslated-region haplotypes in the vitamin D receptor gene predispose to osteoporotic fracture: The Rotterdam Study. *Am J Hum Genet* 2005; **77**:807–823.
- Yu H, Zhu QR, Gu SQ, Fei LE. Relationship between IFN-gamma gene polymorphism and susceptibility to intrauterine HBV infection. *World J Gastroenterol* 2006; **12**:2928–2931.
- Zhu QR, Ge YL, Gu SQ, Yu H, Wang JS, Gu XH, et al. Relationship between cytokines gene polymorphism and susceptibility to hepatitis B virus intrauterine infection. *Chin Med J* 2005; **118**:1604–1609.
- Xu YY, Yu JY, Zhong YW, Song HB, Liu HH, Jia LL, et al. Association between the frequency of class II HLA antigens and the susceptibility to intrauterine infection of hepatitis B virus. *Int J Biol Sci* 2008; **4**:111–115.
- Fischler B, Nyström J, Björnsdóttir T, Lindh G, Hultgren C. Virus-specific T cell immune response in children and adolescents with chronic hepatitis B virus infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; **45**:75–83.
- Koumbi L, Bertoletti A, Anastasiadou V, Machaira M, Goh W, Papadopoulos NG, et al. Hepatitis B-specific T helper cell responses in uninfected infants born to HBsAg +/HBeAg – mothers. *Cell Mol Immunol* 2010; **7**:454–458.
- Bevilacqua E, Fabris A, Floreano P, Pembrey L, Newell ML, Tovo PA, et al. Genetic factors in mother-to-child transmission of HCV infection. *Virology* 2009; **390**:64–70.
- Niro GA, Fontana R, Gioffreda D, Valvano MR, Lacobellis A, Facciorusso D, et al. Tumor necrosis factor gene polymorphisms and clearance or progression of hepatitis B virus infection. *Liver Int* 2005; **25**:1175–1181.
- Du T, Guo XH, Zhu XL, Li JH, Lu LP, Gao JR, et al. Association of TNF-alpha promoter polymorphisms with the outcomes of hepatitis B virus infection in Chinese Han population. *J Viral Hepat* 2006; **13**:618–624.
- Cheong JY, Cho SW, Hwang IL, Yoon SK, Lee JH, Park CS, et al. Association between chronic hepatitis B virus infection and interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphisms. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; **21**:1163–1169.
- Hsu HY, Chang MH, Ni YH, Lee PI. Cytokine release of peripheral blood mononuclear cells in children with chronic hepatitis B virus infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; **29**:540–545.
- Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994; **367**:284–287.
- Ogunkolade BW, Boucher BJ, Prah JM, Bustin SA, Burrin JM, Noonan K, et al. Vitamin D receptor (VDR) mRNA and VDR protein levels in relation to vitamin D status, insulin secretory capacity, and VDR genotype in Bangladeshi Asians. *Diabetes* 2002; **51**:2294–2300.
- Staeva-Vieira TP, Freedman LP. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits IFN-gamma and IL-4 levels during in vitro polarization of primary murine CD4 + T cells. *J Immunol* 2002; **168**:1181–1189.
- Ni YH. Natural history of Hepatitis B virus infection: pediatric perspective. *J Gastroenterol* 2011; **46**:1–8.