

Молекулярная диагностика вируса гепатита С В морфологических субстратах
3-я кафедра внутренних болезней БГМУ, кафедра инфекционных болезней ГГМУ

Изучение тропности ВГС к различным тканям при ревматических заболеваниях может способствовать уточнению патогенетических механизмов синдрома взаимного отягощения, установлению критериев тяжести и прогноза заболевания, усовершенствования принципов лечения сочетанной патологии.

Полагают, что возникновение вирусного артрита зависит не только от вида возбудителя, но и от разновидности одного и того же вида вируса, фазы виремии при развитии инфекционного процесса, тропности вируса к суставным тканям и способности его оказывать цитопатическое действие на поражаемые клетки. Наряду с этим важное значение имеет состояние общих и местных неспецифических и иммунных механизмов противовирусной защиты организма [1].

На ранней стадии вирусной инфекции ведущую роль играют такие факторы, как продукция интерферонов и фагоцитарная активность мононуклеаров, а в последующем - гуморальные и клеточные реакции иммунной системы с разрушением инфицированных клеток лимфоцитами-киллерами, прекращающих таким образом внутриклеточную инфекцию. Нейтрофилы и лимфоциты периферической крови рассматривались нами на предмет инвазии вирусом гепатита С.

В исследовании мы имели длительный период наблюдения за отдельными больными ревматическими заболеваниями в сочетании с ХГС, который составил до 15 лет. Однако, об этом в некоторых случаях мы могли судить только ретроспективно, так как ИФА системы в то время только разрабатывались и субстратом для обнаружения РНК-ВГС служили фиксированные мазки крови на Т- и В- лимфоциты, полученные в градиенте фиколл-верографиновой смеси.

Мазки клеток на предметном стекле в лаборатории молекулярной диагностики УЗ «9 ГКБ» были типированы современными тест-системами на наличие РНК вируса гепатита С *in vitro*, что позволило нам в дальнейшем идентифицировать РНК-ВГС в любом биологическом материале, содержащем клеточные элементы.

Методом ПЦР в тканях исследовано 53 стекла с мазками концентрата нейтрофилов и 20 стекол с мазками концентрата лимфоцитов периферической крови одних и тех же больных. Пациентов с РА было 25 человек, СКВ – 9, СС -5, синдромом Шарпа -1, ОА – 7 и 6 практически здоровых лиц. Вирус гепатита С был обнаружен у 7 пациентов с РА (28%), у 4 больных СКВ (44,4%) и по одному с СС (25%) и ОА (14,3%). Таким образом, из 53 стекол концентрата нейтрофилов ПЦР положительными на вирус гепатита С были 13 образцов – 24,5%. Из 20 образцов концентрата лимфоцитов HCV-позитивными были 9 образцов – 45%. То есть в исследовании нами были получены позитивные результаты как в образцах содержащих концентрат нейтрофилов, так и лимфоцитов. Однако, методика разделения мононуклеаров в фиколл-верографиновой смеси не позволяет приготовить абсолютно чистые образцы суспензии клеток, и мы дополнительно провели иммуноцитохимическое исследование для верификации клеток, подверженных HCV-инфицированию.

Тестирование на ВГС биопсийного материала

Полагают, что роль депо и переносчика артротропной вирусной инфекции в организме, способствующего реинфицированию суставных тканей, могут выполнять

не только циркулирующие лимфоциты и макрофаги, но и содержащиеся в них (персистирующие) вирусы. Существует точка зрения, что различные инфицированные клетки приобретают тропность к синовиальной оболочке вследствие экспрессии на их поверхности специфических антигенов артротропных вирусов [1]. Не исключено, что реинфицирование синовиальной оболочки может происходить также в результате фиксации в ней циркулирующих иммунных комплексов, содержащих инфекционноспособные вирусы, депо которых является хронический очаг, расположенный вне суставов.

В данном разделе нами была исследована иммуногистохимическим методом тропность вируса гепатита С к структурам печеночной, почечной и легочной тканям пациентов, страдающих различными ревматическими заболеваниями. Для выполнения поставленных задач было отобрано 14 пациентов, из них 7 - страдали РА, 3 больных имели суставной синдром на фоне ХГС, 3 больных страдали СКВ, и одна больная – системным склерозом. У 9 пациентов с системными заболеваниями соединительной ткани имел место хронический гепатит С, подтвержденный обнаружением вирусной РНК в биопсийном материале и крови методом ПЦР, двое пациентов имели вирусный микст-гепатит. В 5 случаях для верификации распространенности органного поражения вирусом гепатита С в качестве контроля использовали аутопсийный материал.

Положительными считались иммуногистохимические реакции, в результате которых в исследованной ткани отмечалось отложение позитивных депозитов интенсивного рыже-коричневого цвета (комплекс антиген-антитело, маркированный хромогеном). Отрицательные результаты получены у 2 (14,3%) пациентов, положительный тест на наличие вируса гепатита С – в 11 случаях (78,6%), однако один результат (7,1%) был также положительным при отрицательных данных ПЦР-теста в ткани печени при хроническом лекарственном гепатите на фоне РА (индуцированным метотрексатом). Проведенное через год контрольное исследование ИФА и ПЦР крови не подтвердило наличие вирусной РНК и неструктурных белков, что нами было верифицировано как ложноположительная гистохимическая реакция. Экспрессию NS3 HCV отмечали в ткани печени, преимущественно в цитоплазме гепатоцитов и купферовских клетках, а так же в ядрах отдельных гепатоцитов.

Результаты гистохимического исследования тканевой тропности вируса гепатита С представлены в таблице 1, из которой следует, что ВГС способен поражать различные органные структуры с вовлечением в процесс помимо печеночной, почечной и лимфоидной ткани.

Таблица 1 – Результаты иммуногистохимического и ПЦР исследования в различных тканях у больных ревматическими заболеваниями

| Препарат | ПЦР в крови | ПЦР в биоптате | Иммуногистохимия | Диагноз |
|----------|-------------|----------------|------------------|----------------------|
| 1 | + | + | Печень (+) | РеА С |
| 2 | + | + | Печень (+) | <!--[if !vml]-->РА С |
| 3 | нет | + | Печень (+) | СКВ С |
| 4 | – | – | Печень (–) | РА ХГ |
| 5 | + | + | Печень (+) | РеА С |
| 6 | нет | + | Печень (+) | РА С |

| | | | | |
|----|-----|---|------------|-------|
| 7 | нет | + | Печень (+) | РА С |
| 8 | – | – | Печень (+) | РА С |
| 9 | + | + | Печень (+) | СКВ С |
| 10 | + | + | Печень (+) | РА С |
| 11 | – | + | Печень (+) | РА С |
| 12 | + | + | Печень (+) | СС С |
| 13 | нет | + | Почка (+) | РА С |
| 14 | + | + | Печень (–) | СКВ С |

На результаты иммуногистохимической диагностики оказывает влияние накопление желчных пигментов (хологенная пигментация), что не позволяет визуализировать экспрессию неструктурных белков вируса гепатита С [2]. В нашем исследовании был также зафиксирован один ложноотрицательный случай на 14 иммуногистохимических исследований (7,1%), при позитивном ПЦР тесте печеночного биоптата.

Различия в заключениях, полученные методом молекулярной диагностики вируса гепатита С в тканях и крови свидетельствуют, что ни один метод не является абсолютным. Приходится считаться с наличием ложноположительных и ложноотрицательных заключений не только широко известных при иммуноферментном анализе, но и при ПЦР и иммуногистохимическом исследовании. Только комплексная оценка результатов лабораторных методов позволяет приблизить результаты диагностики HCV-инфекции к максимально возможной.

Тропность ВГС к клеточным элементам печеночной ткани

Нами также была исследована тропность ВГС к отдельным структурам печеночной ткани. Как уже отмечалось ВГС избирательно поражает лимфоциты периферической крови и лимфоидные клетки портального тракта, цитоплазму, ядра купферовских клеток и билиарный эпителий (рисунок 1).

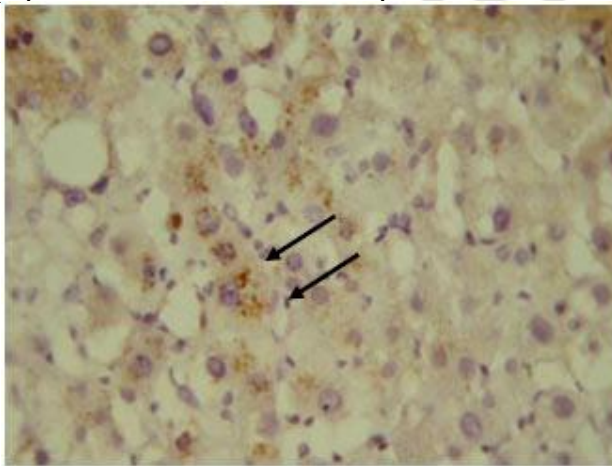


Рисунок 1 – Печень, увеличение x400, экспрессия NS3 в ядре (верхняя стрелка) и цитоплазме гепатоцитов (нижняя стрелка) больного с диагнозом РА ХГ (№ 028 – 321) (HCV в крови не определялся ранее!)

Таким образом, молекулярная диагностика позволила зафиксировать наличие ВГС в ядрах и цитоплазме гепатоцитов, купферовских клеток, билиарном эпителии, лимфоидной ткани, а также верифицировать белки ВГС в ткани до серологической диагностики хронического гепатита С при ревматических заболеваниях. Данная методика позволила также диагностировать ХГС при иммуногистохимическом исследовании биоптата при хроническом криптогенном гепатите с высокой

активностью, протекающего без наличия РНК – ВГС в крови. В практическом плане при длительно существующей гиперферментемии с невозможностью установления этиологического фактора гепатита проведение пункционной биопсии печени с иммуногистохимической оценкой биоптата становится совершенно обоснованной.

Сопоставление результатов молекулярной и ИФА-диагностики ХГС

В связи с недостаточной информативностью клинико-лабораторных тестов, при подозрении на ХГ использующихся на первом этапе обследования пациентов с ревматическими заболеваниями, особую актуальность приобретает вирусологическое исследование сыворотки крови с помощью иммуноферментного анализа и ПЦР.

Как указывают некоторые авторы при доступном иммуноферментном анализе возможны ложноположительные результаты, что чаще всего является следствием наличия в анализируемом образце антител к супероксиддисмутазе, совместно с которой в рекомбинантных дрожжевых клетках синтезируется с100–3, использующийся в качестве антигена в иммуноферментных тест-системах для идентификации ВГС [3]. На результаты тестирования также влияют гипергаммаглобулинемия на фоне системных заболеваний соединительной ткани, недавние вакцинации (особенно к кори), криоглобулинемия, т. к. HCV может образовывать криопреципитат [4]. Сообщалось о ложноположительных результатах после повторного размораживания образцов или после их длительного хранения при нестабильной температуре. Антитела к HCV образуются в среднем за 8 – 20 недель с момента инфицирования или через 15 недель от начала гепатита, у некоторых больных для образования антител требуется около года. Отсутствие антител к HCV не исключает диагноз HCV. Кроме того, 20% больных хроническим HCV могут быть серонегативными, так как содержат низкие титры анти-HCV антител на фоне иммунодефицита или иммуносупрессивной терапии [5, 6].

ПЦР ткани печени в парафиновых срезах проведена нами в 44 случаях, из них в 23 (52,3%) зафиксирован отрицательный результат, в 20 (45,5%) – положительный, в одном случае (2,3%) зафиксирован отрицательный результат ПЦР в ткани при положительном ПЦР в крови пациента, что нами было интерпретировано как ранний период вирусного гепатита С на фоне РА.

Из 136 исследований ПЦР крови тест был положительным у 74 пациентов (54,4%), отрицательным в 62 (45,6%) случаях. В трех случаях (2,2%) положительный ПЦР-тест крови у больных РА сочетался с отрицательными данными ИФА, что было расценено как ложноотрицательные результаты иммуноферментного анализа. Два (0,6 %) отрицательных ПЦР теста сопровождалось положительным заключением по ИФА при реактивном артрите, что позволило интерпретировать результат как ложноположительный, таблица 3.

ИФА на вирус гепатита С проведено в исследованной группе у 332 пациентов. Тест был положительным в 176 случаях (53%) и отрицательным в 139 (41,9%), в 17 случаях результаты теста были сомнительными (5,1 %), таблица 2.

Таблица 2 – Частота получения ложноположительных и ложноотрицательных заключений на вирус гепатита С методом ИФА при различных заболеваниях

| Нозология | Ложноположительные | | Нозология | Ложноотрицательные | |
|-----------|--------------------|-----|---------------------|--------------------|-----|
| | п | % | | п | % |
| РА С | 3 | 0,9 | РА | 3 | 0,9 |
| РеА С | 2 | 0,6 | ХГС выс. активности | 2 | 0,6 |
| СКВ С | 3 | 0,9 | | | |

| | | | | | |
|-------|----|-----|-------|---|-----|
| ПСШ С | 1 | 0,3 | | | |
| ХГС | 2 | 0,6 | ХГ | 1 | 0,3 |
| Всего | 11 | 3,3 | Всего | 6 | 1,8 |

Как видно из таблицы 2 наибольшее число ложноположительных заключений (0,9%) по ИФА-диагностике получено в группе пациентов с СКВ С и РА С, что, на наш взгляд, связано с наличием большого числа циркулирующих иммунных комплексов и несовершенством методики ИФА 1 и 2 поколений для пациентов с аутоиммунной патологией.

Полученные данные свидетельствуют, что при постановке диагноза ХГС на фоне ревматических заболеваний нельзя ориентироваться на результаты одного теста. Все это послужило предпосылкой к сопоставлению результатов различных способов лабораторной диагностики вируса гепатита С.

Нами было отобрано 33 больных, у которых не было однозначной трактовки и направленности в заключениях по наличию вируса гепатита С при ИФА, ПЦР и иммуногистохимической диагностике (таблица 3).

Адаптированной методикой ПЦР в тканях проведено исследование биопсийного материала печени в случаях, когда лабораторная и серологическая диагностика ХГС не позволяла достоверно судить о наличии вируса гепатита С и клинический диагноз не мог быть окончательно установлен.

В целом, изменение окончательного диагноза с учетом результатов молекулярной диагностики биоптата осуществлено у 15 больных из 169 пропунктированных пациентов, что составляет 8,9 %.

Таблица 3 – Соотношение спорных результатов тестирования на ВГС

| Кровь ИФА | Ткань Гисто- химия | Ткань ПЦР | Кровь ПЦР | N 33 | Диагноз | | 5% | Интерпретация результатов |
|--------------|--------------------------|--------------|--------------|---------|------------------------------|-------------------------|----------|-------------------------------------|
| | | | | | Пред- вари- тельный | Окон- чатель- ный | | |
| - | + | - | - | 1 | РА ХГ | РА С | 3,1 | Бессимтомное носительство С |
| - | + | + | - | 2 | РА | РА С | 6,2 | Ложноотрицат. |
| - | нет | + | - | 4 | ХГ | ХГС | 12, 4 | Ложноотрицат. |
| - | нет | + | + | 2 | ХГС | ХГС | 6,2 | Ложноотрицат. |
| - | нет | + | +? | 1 | РА | РА С | 3,1 | Ложноотрицат. |
| + | нет | - | - | 4 | ХГС | ХГ | 12, 4 | Ложноположит. |
| + | нет | - | нет | 2 | РеА С | РеА ХГ | 3,1 | Ложноположит. |
| +? | нет | нет | +? | 2 | РА С | РА С? | 6,2 | Ложноположит. |
| - | - | - | +? | 1 | РА С | РА С? | 3,1 | Внепеченочная репликация? |
| + | + | - | + | 2 | СКВ С | СКВ С | 6,2 | Ранний период С или внепеч репл. |
| + | нет | - | + | 5 | ХГС | ХГС | 15, 6 | Ранний период С или внепеч репл. |
| + | + | - | +? | 2 | РА | РА С | 6,2 | Ранний период С |
| + | нет | нет | + | 2 | РА С | РА С | 6,2 | Ранний период С |
| - | нет | + | нет | 1 | Гипер- билиру- бинемия | ХГС | 3,1 | Пересмотр диагноза |
| - | нет | + | нет | 2 | ХГ выс акт | ХГС | 6,2 | Пересмотр диагноза |

Особенно настораживает гипердиагностика ХГС с использованием ИФА тест-систем, в данном случае мы имеем дело либо с самой ранней стадией ХГС и его внепеченочной пролиферацией, либо с чистой гипердиагностикой данного заболевания. Имеющиеся различия в заключениях обусловлены тем, что ПЦР не требуют осаждения иммунных комплексов, как при ИФА-тестах, следовательно

ложноположительных реакций практически нет. Как отмечено некоторыми авторами из 100 больных с РНК HCV антитела класса Ig M к HCV были обнаружены в 66 % случаев, в то же время из 171 сыворотки с отрицательными ПЦР-данными антитела класса Ig M к HCV были обнаружены в 45 случаях, что свидетельствует либо о ложноположительных результатах, либо о колеблющейся виремии, либо о внепеченочной репликации вируса [7]. В нашем исследовании у 4-х больных (2 – СКВ С, 1 – РА С, 1 – ХГС) были положительны тесты исследования на РНК – ВГС в крови, но отрицательные в ткани печени, что также может быть подтверждением внепеченочной репликации вируса, либо ранней фазой течения ХГС.

Чувствительность и специфичность тестов детекции ВГС в крови и тканях, представлены в таблице 4, из которой следует, что методы молекулярной диагностики высокочувствительны и специфичны.

Таблица 4 – Чувствительность и специфичность тестов детекции ВГС в крови и тканях

| Метод | n | Чувствительность (%) | Специфичность (%) |
|------------------|-----|----------------------|-------------------|
| ПЦР в крови | 136 | 98,6 | 98,4 |
| ПЦР в ткани | 58 | 92,3 | 97,9 |
| Иммуногистохимия | 14 | 90,9 | 66,7 |
| ИФА | 332 | 94,5 | 90,3 |

Учитывая большое число различных аутоантител, методы молекулярной диагностики вирусных гепатитов по анализам крови более оправданы, чем иммуноферментный анализ у лиц с СЗСТ а верификация неструктурных белков ВГС в тканях возможна только с использованием методов молекулярных диагностики (ПЦР в ткани и иммуногистохимии).

Заключение

Очаговая деструкция хрящевой и костной ткани – ведущий механизм повреждения суставов при РА. В поддержании воспалительных изменений, протекающих при ревматических заболеваниях, значительная роль принадлежит нейтрофилам и лимфоцитам. Показано, что наличие неспецифической реактивности нейтрофилов отражает их патогенетическую значимость и избирательную устойчивость к ВГС. Клиническая картина ХГС в целом ряде наблюдений характеризуется не только поражением печеночной ткани, но и различными внепеченочными проявлениями, которые могут быть обусловлены иммунокомплексными механизмами. Более полному пониманию патогенеза системных проявлений при хронической вирусной инфекции будет способствовать установление факта внепеченочной репликации вирусов гепатита, что подтверждено обнаружением антигенов ВГС в лимфоцитах при использовании высокоспецифичных методов ПЦР и иммуногистохимии.

Методами молекулярной диагностики установлена тропность ВГС помимо печеночной к почечной ткани, причем оба органа поражаются одновременно. Неструктурные белки ВГС обнаружены также в ткани легкого (бронхиальном эпителии), лимфоцитах периферической крови и портальных трактов, эпителии билиарных протоков. В клинически неоднозначных ситуациях с высоким уровнем гепатоспецифических ферментов показано морфологическое исследование печеночного биоптата для верификации ВГС в тканях. Иммуногистохимическое

исследование биоптата при криптогенном гепатите позволяет диагностировать вирусное поражение печени, в том числе ХГС, протекающего без наличия РНК – ВГС в крови. С другой стороны ПБП позволяет исключить диагноз ХГС. В группе больных СЗСТ метод ИФА приемлем в основном для скрининга обследуемых на наличие ВГС и предпочтение следует отдавать методам молекулярной диагностики.

Литература

1. Ивашкин, В. Т. Болезни суставов. Пропедевтика, дифференциальный диагноз, лечение / В. Т. Ивашкин, В. К. Султанов. М.: Литтерра, 2005. 544 с.
2. Serum HCV RNA levels correlate with histological liver damage and concur with steatosis in progression of chronic hepatitis C / L. Adinolfi [et al.] // Dig. Dis. Sci. 2001. Vol. 46. № 8. P. 1677–1683.
3. Disappearance of serum HCV-RNA after short-term prednisolone therapy in a patient with chronic hepatitis C associated with autoimmune hepatitis-like serological manifestations / M. Yoshikawa [et al.] // J. Gastroenterol. 1999. Vol. 34. № 2. P. 269–274.
4. False-positive anti-HCV tests in rheumatoid arthritis / L. Theilmann [et al.] // Lancet. 1990. Vol. 335. № 8701. P. 1346.
5. Amarapurkar, D. Role of autoimmunity in nonviral chronic liver disease / D. Amarapurkar, A. Amarapurkar // J. Assoc. Physicians India. 2000. Vol. 48. № 11. P. 1064–1069.
6. Boyer, N. Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C / N. Boyer, P. Marcellin // J. Hepatol. 2000. Vol. 32. № 2. suppl. P. 98–112.
7. Andreas, C. Chisari Pathogenesis of Chronic Hepatitis C: Immunological Features of Hepatic Injury and Viral Persistence / C. Andreas, V. Francis // Hepatology. 1999. Vol. 30. № 3. P. 595–601.