

Возможности молекулярной диагностики вируса гепатита с при ревматических заболеваниях

В исследовании приведена интерпретация результатов различных тестов по диагностике гепатита С при ревматических заболеваниях с использованием методов полимеразной цепной реакции и иммуногистохимии в биоптатах печени, почек, а также в форменных элементах крови. Ключевые слова: Вирус гепатита С, ревматоидный артрит, системная красная волчанка (СКВ), иммуногистохимия, полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Одной из неразрешенных задач ревматологии остается вопрос о происхождении ревматических заболеваний. Целый ряд авторов склоняется к вирусному генезу ревматоидного артрита (РА), системной красной волчанки (СКВ), первичного синдрома Шегрена (ПСШ) и других иммунных патологий.

Методами молекулярной диагностики установлена тропность вируса гепатита С к печеночной и почечной ткани [2]. Неструктурные белки вируса гепатита С (ХГС) обнаружены также в ткани легкого (бронхиальном эпителии), лимфоцитах периферической крови, в портальных трактов и эпителии билиарных трактов [1]. Полученные данные свидетельствуют, что при постановке диагноза ХГС на фоне ревматических заболеваний нельзя ориентироваться на данные одного лишь теста [4,5]. Все это послужило предпосылкой к сопоставлению результатов различных способов лабораторной диагностики вируса гепатита С.

Материал и методы исследования.

Нами было отобрано 32 больных, у которых не было однозначной трактовки и направленности изменений в заключениях по наличию вируса гепатита С по иммуноферментной (ИФА), полимеразной (ПЦР) и гистохимической диагностике ХГС.

Проводили стрептавидин-биотиново-пероксидазную иммуногистохимическую реакцию с использованием коммерческой иммуногистохимической системы LSAB 2 System Peroxidase (DAKO, USA) [7]. В качестве первичных антител использовали моноклональные мышинные антитела к NS3 неструктурному белку вируса гепатита С (ВГС) ? (NS3-HCV) (Novocastra Lab., UK) в разведении 1/50. Для демаскировки искомого антигена в ткани производили высокотемпературную обработку срезов.

Определение серологических маркеров ХГС проводили с помощью ИФА («Abbott», «Sanofi-Paster», НПО «Диагностические системы», г. Н. Новгород) [3]. Вирусная РНК в сыворотке крови больных ХГС определялась с помощью ПЦР, («Hoffman-la-Roche» и НПО «Литех»). Выделение вирусной РНК осуществлялось методом адсорбции ее на частицы силикагеля после денатурации образца гуанидин тиоционатом. В реакции обратной транскриптации в качестве фермента использовали Taq – полимеразу, способную выдержать нагревание до 95°C. На части образцов клеточного материала проведена 2-х стадийная ПЦР с внутренней парой праймеров (nested-PCR) для увеличения чувствительности реакции при малом клеточном составе образца [6].

Для детекции наличия в биологическом материале ВГС использовали мутационно устойчивые праймеры на высококонсервативные области генома

(5г-нетранслируемую область). В работе частично проводилось генотипирование вируса гепатита С посредством использования типоспецифических праймеров.

Полученные результаты

Разработанной методикой проведено исследование биопсийного материала печени, почек и сыворотки крови в тех случаях, когда лабораторная диагностика крови не позволяла достоверно судить о наличии вируса гепатита С и клинический диагноз не мог быть окончательно установлен.

Особенно настораживала гипердиагностика ХГС с использованием тест-систем иммуноферментного анализа, когда мы сталкивались либо с ранней стадией ХГС и внепеченочной пролиферацией вируса, либо с гипердиагностикой данного заболевания. ИФА на ВГС был положительным в 51,8 % случаях и отрицательным в 40,9% у исследованных пациентов. В 7,4 % случаях результаты теста были сомнительными (таблица 1).

Таблица 1

Частота получения ложноположительных и ложноотрицательных заключений по данным ИФА-диагностики ХГС при ревматических заболеваниях

Нозология	Ложноположительные	Нозология	Ложноотрицательные
РА С	0,61 %	РА	0,91%
Реактивный артрит С	0,61 %	Системный васкулит	1,21%
СКВ С	0,91 %	Спондилоартрит	0,30%
ПСШ С	0,30 %	Хронический активный гепатит	0,61 %
ХГС	0,61 %	Хронический гепатит	0,30 %

Как видно из таблицы 2 наибольшее число ложноположительных заключений (0,91%) по ИФА-диагностике получено в группе пациентов с СКВ, что на наш взгляд связано с наличием ярко выраженной системности данного заболевания и большим числом иммунных комплексов, что косвенно подтверждается также наличием и большого числа (1,21%) ложноотрицательных заключений у пациентов с системными васкулитами другого генеза.

ПЦР не требовала осаждения иммунных комплексов, как при ИФА-диагностике, следовательно ложноположительных реакций практически не было. Однако, применить ко всем больным методы молекулярной диагностики на этапе скрининга не представляется возможным из-за длительности получения результата, а также сохраняющейся высокой стоимости исследования. Но и результаты ПЦР диагностики ВГС могли расходиться с данными иммуногистохимического анализа биоптатов, результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

Соотношение спорных результатов тестирования на ВГС

Кровь	Ткань	Ткань	Кровь	№	Диагноз		5%	Комментарий
					ИФА	Гистохимия		
-	+	-	-	1	РА ХГ	РА С	3,1	Бессимптомное носительство С
-	+	-	-	2	РА	РА С	6,2	Ложноотрицат.
-	нет	-	-	4	ХГ	ХГС	12,4	Ложноотрицат.
-	нет	+	+	2	ХГС	ХГС	6,2	Ложноотрицат. по ИФА
-	нет	+	?	1	РА	РА С	3,1	Ложноотрицат.
+	нет	-	-	4	ХГС	ХГ	12,4	Ложноположит.
+?	нет	нет	+?	2	РА С	РА	6,2	Ложноположит.
-	-	-	+?	1	РА С	РА	3,1	Внепеченочная репликация?
+	+	-	+	2	СКВ С	СКВ С	6,2	Ранний период С
+	нет	-	+	5	ХГС	ХГС	15,6	Ранний период С
+	+	-	+?	2	РА	РА С	6,2	Ранний период С
+	нет	нет	+	2	РА С	РА С	6,2	Ранний период С
-	нет	+	нет	1	Гипербилирубинемия	ХГС	3,1	Пересмотр диагноза
+	нет	-	нет	1	ХГС и В	ХГ	3,1	Пересмотр диагноза
-	нет	-	нет	2	ХГ	ХГС	6,2	Пересмотр диагноза

Один пациент с РА на фоне ХГ с высокой лабораторной активностью имел положительный результат при гистохимическом исследовании печеночного биоптата при отрицательных данных ПЦР-теста в ткани печени. 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 или вариант бессимптомного носительства вируса гепатита С без его репликации.

Учитывая большое число различных аутоантител, методы молекулярной диагностики вирусных гепатитов более оправданы чем иммуноферментный анализ у лиц с системными заболеваниями соединительной ткани. У пациентов, стойкопозитивных по ИФА вируса гепатита С и отрицательных по ПЦР сыворотки крови, может быть положительный клинический эффект от интерферонотерапии. В этих случаях нельзя исключить колеблющуюся виремиею или внепеченочную локализацию вируса [2].

Заключение.

Имеются различия в результатах молекулярной диагностики вируса гепатита С в тканях и сыворотке крови, что свидетельствует о различной тропности вируса гепатита С к тканям и указывает на сложный процесс формирования виремиею.

В тоже время приходится признать о наличии сомнительных заключений не только при ИФА диагностике, но и при ПЦР и иммуногистохимическом исследовании. Лишь комплексная оценка результатов лабораторных методов позволяет приблизить результаты диагностики HCV-инфекции к абсолютно доказанным.

Литература

1. Губкин С.В. Тропность вируса гепатита С к биологическим средам при системных заболеваниях соединительной ткани // Белорусский медицинский журнал. – № 2. – 2005. – С. 32 – 33.
2. Соринсон С.Н. Вирусные гепатиты в клинической практике. – СПб.: ТЕЗА, 1998. – 331 с.
3. Юпатов Г.И. Обнаружение маркеров вирусных гепатитов у больных ревматоидным артритом с помощью иммуноферментного анализа //

Иммунодиагностика и иммунотерапия: Труды 1 Междунар. конф. – Витебск, 1995. – С. 174 – 175.

4. Boyer N., Marcellin P. Patogenesis, diagnosis and management of hepatitis C // J. Hepatol. – 2000. – Vol. 32, Suppl. №.2. – P. 98 – 112.

5. Manns M., Rambusch E. Autoimmunity and extrahepatic manifestations in hepatitis C virus infection // J. Hepatol. – 1999. – Vol. 31, Suppl. 1. – P. 39 – 42.

6. Savage K., Dhillon A., Schmilovitz-Weiss H. et al. Detection of HCV-RNA in paraffin-embedded liver biopsies from patients with autoimmune hepatitis // J. Hepatol. – 1995. – Vol. 22. – № 1. – P. 27 – 34.

7. Tan J., Hytioglou P., Wiczorek R. et al. Immunohistochemical evidence for hepatic progenitor cells in liver diseases // Liver. – 2002. – Vol. 22. – № 5. – P. 365 – 73.