

УДК 616.36-002:578.825.11

Диагностика герпетической инфекции в биоптатах печени у больных хроническими гепатитами В и С

В.В. Голубцов, Ю.В. Крылов, В.М. Семенов, Е.В. Стычневская

УО «Витебский государственный медицинский университет», г. Витебск, Беларусь

Diagnostic of herpes infection persistence in the liver biopsies of patient with chronic hepatitis B and C

V.V. Golubtzov, U.V. Krilov, V.M. Semenov, E.V. Stichnevskaya

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

Аннотация

Проведена сравнительная характеристика гистологического, иммуногистохимического методов и метода флюоресцирующих антител при герпетической инфекции. Нами установлено, что наиболее точным и рациональным лабораторным методом диагностики персистенции герпетической инфекции в биоптатах печени больных хроническим гепатитом В и С является иммуногистохимический метод (чувствительность метода 91%, специфичность-97%, доля истинных результатов-95%). Однако, только комбинированный подход с использованием сочетания гистологического и иммуногистохимического методов, лежащих в основе алгоритма диагностики герпетической инфекции, дает возможность объективного и достоверного определения герпетической инфекции с установлением типа вируса (I и/или II тип), фазы (острая, хроническая, обострение хронической) и стадии персистенции (активная, неактивная). Показанием для назначения специфической противогерпетической терапии при хроническом гепатите В или С является активная стадия персистенции герпетической инфекции, которая определяется сочетанием наличия внутриядерных герпетических включений I и/или II типа и положительной иммуногистохимической реакцией.

Ключевые слова

Диагностика, персистенция, герпетическая инфекция, биоптаты печени, хронические гепатиты В и С.

Известно, что герпетическая инфекция может приводить как к развитию генерализованной инфекции, так и к поражению отдельных органов. Установлена этиопатогенетическая

Summary

The article deals with comparative characteristic of histological, immunohistochemical methods and fluorescent antibodies one. We revealed that more precise and rational laboratory method of diagnostic of herpes virus persistence in the liver biopsies of patient with chronic hepatitis B and C was immunohistochemical method (sensitivity 91%, specificity 97%, reliable results rate 95%). However, only combine approach with using histological and immunohistochemical methods, which serve as the base for diagnosing algorithm of herpes infection, gives the possibility of objective and reliable determination of herpes infection with identification of virus type (I and/or II), phase (acute, chronic, exacerbation of chronic) and persistence stage (active, inactive). Indication for administration of specific antiviral therapy in case of chronic hepatitis B and C is an active stage of herpes infection persistence, which is determined by presence of intranuclear herpetic inclusions I and/or II type and positive immunohistochemical reaction.

Key words

Diagnostic, persistence, herpes infection, liver biopsies, chronic hepatitis B and C

роль и описаны морфологические изменения в тканях при поражении вирусом простого герпеса при раке шейки матки, предстательной железы, а также в формировании другой онкопато-

логии, в развитии сердечно-сосудистых заболеваний и легочных поражений, сформирована концепция и описаны поражения различных органов при генерализованной герпетической инфекции, изучаются различные варианты поражения головного мозга при герпетической инфекции [1,2,3,4,5]. В то же время роль герпес-вирусов в течении хронических диффузных поражений печени, при вирусных гепатитах остается практически не изученной. Для правильной оценки роли герпетической инфекции в патологии печени необходима ее достоверная диагностика.

В связи с этим целью нашего исследования явилась сравнительная характеристика методов диагностики персистенции герпетической инфекции с определением наиболее точного и информативного метода, разработка алгоритма диагностики герпетической инфекции и определение показаний для назначения специфической противогерпетической терапии больным с хроническими гепатитами В и С.

Материалы и методы исследования

Материалом для исследования явились 44 биоптата печени с установленным лабораторно (на основании определения РНК-НСV в полимеразной цепной реакции и анти-НСV в ИФА) и подтвержденным морфологически диагнозом хронического гепатита С. Исследуемые биоптаты фиксировали в 10% забуференном растворе формалина, заливали в парафин, готовили неокрашенные гистопрепараты для метода флюоресцирующих антител (МФА) и иммуногистохимического метода (ИГХ), а также препараты, окрашенные гематоксилином и эозином для гистологического исследования. Затем с помощью МФА и ИГХ выявляли антиген ВПГ-1 типа. Расчет чувствительности, специфичности и доли истинных результатов (доли правильных прогнозов) каждого метода проводили с помощью специальных формул.

Истинно положительным считался результат в том случае, когда имелись одновременно гистологические признаки герпетической инфекции и положительная реакция МФА и/или ИГХ. В случаях, когда гистологические признаки отсутствовали и наблюдалась отрицательная реакция МФА и/или ИГХ результаты расценивались как истинно отрицательные. Если гистологические признаки отсутствовали, а МФА и/или ИГХ давали положительную реакцию, то такой результат оценивали как ложноположительный. И те тесты, в которых имелись гистологические

признаки, а МФА и/или ИГХ давали отрицательную реакцию, расценивались нами как ложноотрицательные.

Расчет специфичности производили по формуле: $100\text{ЧИО}/(\text{ИО}+\text{ЛП})$, чувствительности по формуле: $100\text{ЧИП}/(\text{ИП}+\text{ЛО})$, доли истинных результатов по формуле: $100\text{Ч}(\text{ИО}+\text{ИП})/(\text{ИО}+\text{ИП}+\text{ЛО}+\text{ЛП})$, где ИО-число истинно отрицательных результатов, ЛП-число ложноположительных результатов, ИП-число истинно положительных результатов, ЛО-число ложноотрицательных результатов.

Результаты и обсуждение

Согласно литературным данным чувствительность МФА составляет 70-75%, специфичность 90%; чувствительность ИГХ метода составляет 90%-95%, специфичность 100%.

Результаты МФА метода: в 10-ти случаях из 44 были получены истинно положительные результаты, в 4-х-ложноположительные, также в 4-х-ложноотрицательные и ли специфичность: $100\text{Ч}26/(26+4)=86\%$, чувствительность: $100\text{Ч}10/(10+4)=70\%$, доля истинных результатов: $100\text{Ч}(26+10)/(26+10+4+4)=82\%$. Метод используется в основном для экспресс-диагностики герпетической инфекции (время выполнения 2 часа). К достоинствам МФА относят возможность его использования для определения морфологической локализации антигена, стадии процесса, а также доступность. Недостатком считается трудность установления каких-либо количественных параметров теста, недостаточная чувствительность, специфичность, доля истинных результатов, высокая стоимость (стоимость 1 ампулы на 30 исследований составляет 6300 тыс.белорусских рублей).

Результаты ИГХ метода: в 10-ти случаях из 44 были получены истинно положительные результаты, в 1-м-ложноположительные, также в 1-м-ложноотрицательные и в 32-х истинно отрицательные результаты. Используя эти данные рассчитываем специфичность: $100\text{Ч}32/(32+1)=97\%$, чувствительность: $100\text{Ч}10/(10+1)=91\%$, долю истинных результатов: $100\text{Ч}(32+10)/(32+10+1+1)=95\%$. Время исполнения теста 1 сутки. Принципиальным отличием иммуногистохимии от других методов иммунологической диагностики, использующих реакцию антиген-антитело, является структурная специфичность исследования. Это означает, что в реакции оценивается не только наличие сигнала (есть окрашивание или нет) и его сила (интенсивность окрашивания), но и пространственное распре-

ление сигнала в гистологическом препарате (окрашивание мембран клеток, цитоплазмы, ядра и других структурных элементов). Метод является высокоспецифичным и высокочувствительным, более низкая стоимость по сравнению с МФА (стоимость набора для 96 исследований составляет до 1800 тыс. белорусских рублей). Кроме того, данный метод позволяет не только более достоверно идентифицировать тип инфекционного агента, но и определить фазу процесса, что имеет существенную роль для определения тактики лечения, а также позволяет определить характер патологического процесса в плохо сохранившихся биоптатах или биоптатах с недостаточным объемом материала.

Общим недостатком этих методов является то, что они позволяют выявить антиген ВПГ в течении первых двух недель острого периода, после этого срока постановка диагноза базируется на результатах световой микроскопии.

Гистологический метод заключался в выявлении внутриядерных герпетических включений I (крупные гиперхромные ядра) и/или II (появление вакуолей с мелкими базофильными или эозинофильными включениями) типов. Причем преобладание включений I типа характерно для острого течения болезни (активная фаза персистенции), преобладание включений II типа характерно для хронического течения болезни (латентная фаза персистенции). Наличие одновременно внутриядерных герпетических включений обоих типов свидетельствует об острой фазе процесса на фоне признаков хронического течения. Результативность гистологического метода достаточно высока и достигает 96-99%. Данный метод диагностики является ведущим, поэтому при отрицательных лабораторных методах диагностики (МФА, иммуногистохимический) диагноз устанавливался на основании обнаружения морфологических признаков герпетической инфекции, а положительные лабораторные методы диагностики без морфологических признаков инфекционного процесса не являлись диагностическими. С помощью данного метода можно определить фазу процесса персистенции, но нельзя установить тип вируса и особенно стадию процесса (активная, неактивная), что имеет существенное значение для назначения в последующем специфической противогерпетической терапии.

Кроме того, для определения персистенции герпетической инфекции в печени существует еще и метод полимеразной цепной реакции

(ПЦР). Полимеразная цепная реакция - метод быстрой диагностики, он высокочувствителен (95%) и специфичен (90-100%), относительно вышеописанных методов является недорогим (набор на 110 исследований стоит 380 тыс. белорусских рублей). Необходимое время - 1-2 дня. Однако, данный метод связан с рядом трудностей в заборе, хранении и приготовлении материала, а также он не дает информации о фазе и стадии процесса персистенции, что имеет большое значение для дальнейшей тактики лечения.

Мы предлагаем алгоритм диагностики герпетической инфекции в печени, с помощью которого устанавливается не только тип вируса, но также определяется фаза и стадия персистенции.

Алгоритм диагностики персистенции герпетической инфекции в биоптатах печени включает несколько этапов. На первом этапе - гистологическом устанавливается факт наличия или отсутствия внутриядерных герпетических включений I и / или II типов. На втором этапе - только при наличии морфологических маркеров герпетической инфекции с помощью дополнительных лабораторных методов (МФА, ПЦР, иммуногистохимический) определяется этиология инфекционного процесса (вирус простого герпеса 1 и / или 2 типа), стадия процесса (активная, неактивная), а также выявляется фаза процесса (острая-преобладают внутриядерные включения I типа, хроническая-преобладают включения II типа, обострение хронической-одновременно имеются включения I и II типов).

Следует помнить, что иммуногистохимический метод как и другие методы позволяют выявить антиген ВПГ только в течении первых двух недель острого периода. После этого срока постановка диагноза базируется только на результатах световой микроскопии. Поэтому, при наличии морфологических признаков персистенции герпетической инфекции и отрицательных результатах лабораторных методов заключение дается на основании гистологических маркеров с указанием стадии персистенции (неактивная) герпетической инфекции, но без указания типа вируса и специфическая противовирусная терапия в данном случае не показана. В случаях положительного результата при проведении иммуногистохимического исследования, наличия морфологических признаков персистенции герпетической инфекции в заключении указывается тип вируса, стадия процесса персистенции (активная), а также фаза процесса (острая, хроническая, обострение хронической), с назначением специфической противовирусной терапии.

Вместо ИГХ метода в схеме возможно использование МФА, но ввиду его более низкой чувствительности и специфичности предпочтение отдается ИГХ методу.

Заключение

Таким образом, наиболее точным и рациональным лабораторным методом диагностики персистенции герпетической инфекции в биоптатах печени больных хроническим гепатитом В и С является иммуногистохимический метод (чувствительность метода 91%, специфичность-97%, доля истинных результатов-95%). Метод ПЦР-исследования, хоть и является относительно недорогим и высокоспецифичным, но сопряжен с рядом трудностей в заборе, хранении и приготовлении материала. Самым дешёвым методом исследования является МФА, однако спе-

цифичность и чувствительность его далеко уступает двум предыдущим. Основой алгоритма диагностики персистенции герпетической инфекции является комбинация гистологического и ИГХ, которая дает возможность объективного и достоверного определения герпетической инфекции с установлением типа вируса, фазы и особенно стадии персистенции, что имеет существенное значение для назначения в последующем специфической противогерпетической терапии. Показанием для назначения специфической противогерпетической терапии при хроническом гепатите В или С является активная стадия персистенции герпетической инфекции, которая определяется сочетанием наличия внутриядерных герпетических включений I и/или II типа и положительной иммуногистохимической реакцией.

Литература

1. Кудин, А. П. Роль Herpes simplex в патологии человека. Часть 2. Клиника герпетической инфекции. Медицинские новости. 2004; 7: 55-62.
2. Генерализованная герпетическая инфекция: факты и концепция / А.Г. Коломиец [и др.]; под общ. ред. В.И. Вотякова, А. Г. Коломийца. – Минск: Наука и техника.: 1992.
3. Хахалин, Л.Н. Герпесвирусные заболевания человека. Клиническая фармакология и терапия.1998; 7: 10-15.
4. Tashiro, T. A. Pathological study of herpes simplex virus infections in adults. Kansenshogaku Zasshi. 1989; 8: 859-866.
5. Цинзерлинг, А.В. Современные инфекции. Патологическая анатомия и вопросы патогенеза. Спб: Сотис. 1993: 78-84.

Адрес:

*Голубцов Владислав Валерьевич
г. Витебск, 210602, пр-т Фрунзе, 27
кафедра патологической анатомии ВГМУ
тел: +375 (029) 713-27-70*

Поступила 10.02.09 г.