

# Obecność przeciwciał antykardiolipinowych w krioglobulinach izolowanych z surowic pacjentów zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu C

Joanna Jabłońska<sup>1</sup>, Jakub Ząbek<sup>2</sup>, Joanna Kozłowska<sup>1</sup>, Iwona Krzewska<sup>2</sup>

1 Klinika Hepatologii i Nabytych Niedoborów Immunologicznych, Uniwersytet Medyczny, Warszawa

2 Zakład Mikrobiologii i Serologii, Instytut Reumatologii im. Eleonory Reicher, Warszawa

## SŁOWA KLUCZOWE

HCV, kompleksy immunologiczne, krioglobulinemia, przeciwciała antykardiolipinowe

## STRESZCZENIE

**WPROWADZENIE** Większość pozawątrobowych manifestacji zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C (*hepatitis C virus* – HCV) wiąże się z oddziaływaniem wirusa na układ odpornościowy człowieka. Ważnym elementem patogenezы zaburzeń immunologicznych w przewlekłych zakażeniach jest obecność krążących kompleksów immunologicznych. Analiza składu kompleksów immunologicznych jest trudna, gdyż przeciwciała związane z antygenami mogą „wymykać się” klasycznym metodom oznaczania.

**CELE** Oznaczenie miana przeciwciał antykardiolipinowych (*anticardiolipin antibodies* – ACA) w krioglobulinach pacjentów zakażonych HCV przed zdysocjowaniem kompleksów immunologicznych oraz po nim, a także ocena korelacji wyników z objawami klinicznymi.

**PACJENCI I METODY** Badano materiał pobrany od 27 pacjentów (19 kobiet i 8 mężczyzn) zakażonych HCV z krioglobulinemią.

**WYNIKI** W 59% przypadków w krioprecypitacie wykryto ACA związane w kompleksach immunologicznych przy braku tych przeciwciał w surowicach. Korelacja pomiędzy występowaniem w krioprecypitacie (przed dysocjacją kompleksów) przeciwciał przeciwko HCV (anty-HCV) i ACA wynosiła 0,47213 ( $p < 0,01$ ). Korelacja pomiędzy obecnością anty-HCV i ACA we frakcji immunoglobulin w zdysocjowanych krioprecypitatach wynosiła 0,61 ( $p = 0,0007$ ). Stwierdzono istotny statystycznie związek pomiędzy występowaniem plamicy (*vasculitis*) a obecnością ACA w krioprecypitacie przed zdysocjowaniem kompleksów immunologicznych ( $p < 0,002$ ) oraz po nim ( $p < 0,05$ ).

**WNIOSKI** W badanej grupie chorych zakażonych HCV z krioglobulinemią w znacznym odsetku przypadków w krioprecypitacie po zdysocjowaniu kompleksów immunologicznych można wykryć ACA niewystępujące w surowicy. Obecność ACA w krioprecypitacie w sposób istotny statystycznie koreluje z występowaniem zmian skórnych typu *vasculitis*.

## Adres do korespondencji:

dr med. Joanna Jabłońska,  
Klinika Hepatologii i Nabytych  
Niedoborów Immunologicznych,  
Uniwersytet Medyczny,  
ul. Wolska 37, 01-201 Warszawa,  
tel.: 022-335-53-40,  
fax: 022-631-05-35,  
e-mail: joannaj108@hotmail.com  
Pol Arch Med. Wewn. 2008;  
118 (Suppl): 20-24  
Copyright by Medycyna Praktyczna,  
Kraków 2008

**WPROWADZENIE** Zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C (*hepatitis C virus* – HCV) może wywoływać liczne manifestacje pozawątrobowe. Mechanizmy, które mogą być odpowiedzialne za wystąpienie tych objawów, nie zostały dobrze poznane. Najlepiej udokumentowaną manifestacją pozawątrobową zakażenia HCV jest krioglobulinemia, definiowana jako obecność we krwi

immunoglobulin odwracalnie precypitujących w chłodzie. Melzer w 1966 roku<sup>1</sup> opisał zespół 3 objawów typowych dla krioglobulinemii (triada Melzera): plamicę, bóle stawów i osłabienie. Niekiedy towarzyszyć im może polineuropatia obwodowa i uszkodzenie nerek przebiegające z proteiniurią oraz zespołem nerczycowym.

Wydaje się, że większość pozawątrobowych manifestacji zakażenia HCV wiąże się z oddziaływaniem wirusa na układ odpornościowy człowieka. Ważnym elementem patogenetyki zaburzeń immunologicznych w przewlekłych zakażeniach jest obecność krążących kompleksów immunologicznych (KKI). Analiza składu kompleksów immunologicznych jest trudna, gdyż przeciwciała związane z antygenami mogą „wymykać się” klasycznym metodom oznaczania. Krioprecypitat jest szczególnym rodzajem zbioru kompleksów immunologicznych, immunoglobulin i wielu innych składników – nadal nie do końca poznany. Wiadomo, że w precipitującym w chłodzie kompleksie znajdują się cząstki HCV, czynniki reumatoidalne oraz przeciwciała przeciwko HCV (anty-HCV),<sup>2</sup> ale jego skład nie został do końca poznany. W niniejszym badaniu podjęto próbę oceny częstości występowania przeciwciał antykardiolipinowych (*anticardiolipin antibodies* – ACA) i anty-HCV u pacjentów zakażonych HCV z krioglobulinemią – zarówno w surowicy, jak i w krioprecypitacie – przed zdysocjowaniem kompleksów immunologicznych i po nim.

**PACJENCI I METODY** Badano surowice i krioprecypitaty 27 pacjentów zakażonych HCV z krioglobulinemią: 19 kobiet (70%) i 8 mężczyzn (30%). Średnia wiek wynosiła 48,8 roku (32–66 lat).

U 11 osób (46%) stwierdzono zmiany skórne typu *vasculitis*, u 16 osób (59%) nasilone dolegliwości stawowe, u 7 zaś inne objawy:

- 1 polineuropatia – u 2 osób
- 2 zapalenie naczyń oka – u 1 osoby
- 3 zespół Behçeta – u 1 osoby
- 4 chłoniak niezłośliwy w wywiadzie – u 3 osób.

Krioglobuliny oznaczano metodą według Broueta i wsp.<sup>3</sup>

Analizę obecności przeciwciał anty-HCV i ACA obecnych w KKI, które stanowią część krioprecypitatu, przeprowadzono dwuetapową metodą własną opracowaną w Zakładzie Mikrobiologii i Serologii Instytutu Reumatologii, polegającą na wytrącaniu KKI glikolem polietylenowym 6000 według Świerczyńskiej i wsp.<sup>4</sup>, a następnie – po rozpuszczeniu krioglobulin w buforze Tris-HCl 0,05 M o pH = 2,50 (w celu zdysocjowania przeciwciał od antygenów w KKI) – na wytrąceniu nasączonym siarczanem amonu frakcji  $\gamma$  (do 33% nasączenia siarczanem amonu) z krioglobulinami. Uzyskany osad immunoglobulin rozpuszczano w płynie buforującym surowicę o pH = 7,40 i oznaczano w nim stężenie białka (metodą spektrofotometryczną wg Kalekara) oraz miana i awidność ACA (metodami opisywanymi powyżej).<sup>5</sup>

Miano ACA (w klasie immunoglobulin G [IgG]) oznaczano metodą ELISA na zestawach typu Autostart™ II ACA IgG firmy Hyeor Biomedical GmbH (Niemcy), dystrybutor Biomedica Poland Sp. z o.o.

Miano przeciwciał anty-HCV oznaczano metodą ELISA na zestawach typu ETI-AB-HCVK-4 firmy Dia Sorin S.p.A (Włochy), dystrybutor Biomedica Poland Sp. z o.o.

Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem testu Wilcozona. Związki między zmiennymi natury ilościowej zbadano za pomocą analizy korelacji z użyciem współczynnika korelacji Spearmana.

**WYNIKI** Analizowano częstość występowania ACA i anty-HCV w surowicach, krioprecypitacie oraz frakcji  $\gamma$  izolowanej z KKI w grupie pacjentów przewlekle zakażonych HCV. Wyniki przedstawiono w **TABELI 1**. W żadnej z badanych surowic nie wykryto wolnych ACA i tylko w jednym z badanych krioprecypitatów przed dysocjacją wykryto ACA. Po zdysocjowaniu kompleksów immunologicznych, w krioprecypitacie, we frakcji  $\gamma$  w 16 przypadkach (59%) znaleziono ACA (klasy IgG).

We wszystkich surowicach występowały przeciwciała anty-HCV, ale tylko w 14 z badanych krioprecypitatów (52%) przed dysocjacją wykryto anty-HCV. Po zdysocjowaniu kompleksów immunologicznych w krioprecypitacie we frakcji gamma w 9 przypadkach wykryto przeciwciała anty-HCV (klasy IgG).

Przeanalizowano wzajemne korelacje występowania ACA i anty-HCV, ponieważ wyniki oznaczeń występujących przypadku obu tych przeciwciał wykazywały, że ACA występują głównie w KKI, zaś anty-HCV we wszystkich 3 analizowanych materiałach. Wartości współczynników korelacji ( $r$ ) występowania ACA i anty-HCV przedstawiono w **TABELI 2**.

Korelacja między obecnością ACA w krioprecypitacie i we frakcji IgG po zdysocjowaniu kompleksów w krioprecypitacie wynosiła 0,796 ( $p < 0,001$ ). Korelacja między występowaniem w krioprecypitacie (przed dysocjacją kompleksów) anty-HCV i ACA wynosiła 0,47213 ( $p < 0,01$ ). Korelacja między obecnością ACA we frakcji IgG po zdysocjowaniu kompleksów immunologicznych w krioprecypitacie a obecnością anty-HCV w krioprecypitacie przed dysocjacją wynosiła 0,684 ( $p < 0,0001$ ). Korelacja między obecnością anty-HCV i ACA we frakcji immunoglobulin w zdysocjowanych krioprecypitatach wynosiła 0,61 ( $p = 0,0007$ ).

Stwierdzono istotny statystycznie związek między występowaniem zmian skórnych a obecnością ACA w krioprecypitacie przed zdysocjowaniem kompleksów immunologicznych ( $p < 0,002$ ) oraz po nim ( $p < 0,05$ ), a także istotny statystycznie związek pomiędzy występowaniem bólów stawów a obecnością ACA w krioprecypitacie przed zdysocjowaniem kompleksów immunologicznych ( $p < 0,05$ ) oraz po nim ( $p < 0,03$ ).

**OMÓWIENIE** Definicja zespołu antyfosfolipidowego związanego z obecnością ACA zmieniła się kilkakrotnie w ciągu ostatniego trzydziestolecia. Główne kryteria kliniczne to występowanie incydentów zakrzepowych oraz niepowodzeń położniczych. Jednak z zespołem antyfosfolipidowym można wiązać różne objawy stwierdzane przez lekarzy wielu specjalności medycznych.<sup>6</sup> Stwierdzono także przejściowe

**TABELA 1** Częstość (%) występowania ACA i anty-HCV w surowicach, krioprecypitatach oraz frakcji  $\gamma$  izolowanej z KKI w grupie pacjentów z wirusowym zapaleniem wątroby typu C

Analizowany materiał	Swoistość przeciwciała			
	ACA (IgG)		anty-HCV (IgG)	
	n	%	n	%
surowica pełna	0/27	0	27/27	100
krioprecypitat	1/27	3,7	14/27	52
frakcja $\gamma$ z krioprecypitatu <sup>a</sup>	16/27	59	9/27	33

<sup>a</sup> Frakcja  $\gamma$  strącana na kwaśno (pH = 2,50) z krioprecypitatu

Skróty: ACA – przeciwciała antykardiolipinowe, anty-HCV – przeciwciała przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu C, IgG – immunoglobuliny G, KKI – krążące kompleksy immunologiczne

**TABELA 2** Korelacja (r) występowania ACA i anty-HCV (liczone testem Spearmana) w surowicach, krioprecypitacie i w frakcjach  $\gamma$  z KKI

Korelowane wartości	ACA surowica	ACA krioprecypitat	ACA z frakcji $\gamma$	anty-HCV krioprecypitat	anty-HCV z frakcji $\gamma$
ACA – surowica		brak	brak	brak	brak
ACA – krioprecypitat	brak		0,79 p < 0,001	0,47 p < 0,01	brak
ACA z frakcji $\gamma$ (z krioprecypitatu)	brak	0,79 p < 0,001		0,68 p < 0,0001	0,61 p = 0,0007
anty-HCV – krioprecypitat	brak	0,47 p < 0,01	0,68 p < 0,0001		0,71 p < 0,0001
anty-HCV z frakcji $\gamma$ (z krioprecypitatu)	brak	brak	0,61 p = 0,0007	0,71 p < 0,0001	

Skróty: patrz TABELA 1

pojawianie się ACA podczas infekcji. W tych przypadkach zazwyczaj ich miano było małe i nie stwierdzano incydentów zakrzepowych. U osób zakażonych HCV wykrywano ACA w około 15% przypadków, zazwyczaj w małych mianach.<sup>7</sup> Zwraca uwagę, że w badanych 27 przypadkach w żadnej z surowic nie wykryto ACA, zaś w krioprecypitacie przed zdysocjowaniem kompleksów – tylko w 1 przypadku. Są to wyniki odbiegające od podawanych w piśmiennictwie. Badana grupa pacjentów była jednak wyselekcjonowana – wszyscy chorzy mieli wyraźną krioglobulinemię i kompleksemię, można więc oczekiwać, że ACA mogą być częściej związane w kompleksy immunologiczne.

Po zdysocjowaniu kompleksów z krioprecypitatu ACA wykryto w 16 przypadkach (59%). Wiadomo, że cząsteczki HCV wiążą się w surowicy z lipoproteinami o bardzo małej gęstości (*very low density lipoprotein* – VLDL). Twory te są zazwyczaj nietrwałe i heterogenne, i występują w małych stężeniach, ich dokładna charakterystyka nie jest więc znana. Można jednak przypuszczać, że tego rodzaju struktury (HCV+VLDL) mogą wiązać przeciwciała przeciwko fosfolipidom, w tym ACA. Można wstępnie przypuszczać, że anty-HCV i ACA wchodzi w skład określonego typu kompleksów krioprecypitujących. Przypuszczalny skład takiego kompleksu (krioglobuliny) to: HCV + anty-HCV + czynnik reumatoidalny + VLDL + ACA.

Obecność czynnika reumatoidalnego i anty-HCV w krioprecypitacie wykazywano we wcześniejszych doniesieniach.<sup>2</sup>

Z drugiej strony uzyskane wyniki mogą wskazywać na występowanie co najmniej 2 typów KKI: zawartych w krioprecypitatach i w supernatancie z nad krioprecypitatu. W supernatantach z nad krioprecypitatu wykryto KKI i anty-HCV w dużym mianie, co może świadczyć o obecności w nich innego typu kompleksów immunologicznych.

Związek pomiędzy występowaniem zmian skórnych i dolegliwości stawowych a obecnością ACA wymaga dalszej oceny, ale nie można wykluczyć roli tych przeciwciał w indukowaniu przynajmniej niektórych objawów związanych z krioglobulinemią. Trudności diagnostyczne mogą wiązać się z faktem, że ACA są związane w kompleksy i nie są wykrywane w powszechnie wykonywanych testach służących do oznaczania ACA w surowicy. Celowe wydaje się zatem badanie obecności i składu KKI występujących u chorych zakażonych HCV.

**WNIOSKI** W badanej grupie chorych zakażonych HCV z krioglobulinemią w znacznym odsetku przypadków w krioprecypitacie po zdysocjowaniu kompleksów immunologicznych można wykryć ACA niewystępujące w surowicy.

Obecność ACA w krioprecypitacie w sposób istotny statystycznie koreluje z występowaniem zmian skórnych typu *vasculitis*.

## PIŚMIENNICTWO

- 1 Meltzer M, Ranklin FC, Elias K, et al. Cryoglobulinemia – a clinical and laboratory study. II. Cryoglobulins with rheumatoid factor activity. *Am J Med.* 1966; 40: 837-856.
- 2 Jabłońska J, Ząbek J, Łoch T, et al. Krioglobulinemia u chorych zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu C. Część I – wybrane aspekty immunologiczne. *Hepatoł Pol.* 2000; 6: 165-170.
- 3 Brouet JC, Claudel JP, Danon F, et al. Biological and chemical significance of cryoglobulins: a report of 86 cases. *Am J Med.* 1974; 57: 775-779.
- 4 Świerczyńska Z, Rydułtowska H, Woźniczko-Orłowska G, et al. A new method for the detection of circulating immune complexes by immunophoretic analysis. *Reumatologia.* 1979; 12: 269-277.
- 5 Wolter T, Gassmann C, Vetter V, et al. Avidity determination: utilization of a basic immunological mechanism allows improvement of the serodiagnosis of infections. *Clin Lab.* 1997; 43: 125-135.
- 6 Zimmermann-Górska I. XX-lecie zespołu antyfosfolipidowego. *Pol Arch Med Wewn.* 2007; 117 (Suppl): 8-12.
- 7 Sene D, Piette JC, Cacoub P. Antiphospholipid syndrome and infections. *Autoim Rev.* 2008; 7: 272-277.

# Presence of anticardiolipin antibodies in cryoglobulins isolated from sera of hepatitis C virus infected patients

Joanna Jabłońska<sup>1</sup>, Jakub Ząbek<sup>2</sup>, Joanna Kozłowska<sup>1</sup>, Iwona Krzewska<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Hepatology and Acquired Immunodeficiencies, Medical University, Warszawa, Poland

<sup>2</sup> Department of Microbiology and Serology, Eleonora Reicher Rheumatology Institute, Warszawa, Poland

## KEY WORDS

anticardiolipin antibodies, cryoglobulins, HCV, immune complexes

## ABSTRACT

**INTRODUCTION** Most extrahepatic manifestations of the hepatitis C virus (HCV) infection are connected with influence of virus on the host's immune system. An important part of immunologic disturbances in chronic infections is the presence of circulating immune complexes. Standard serologic methods are not applicable in analysis of complexes composition.

**OBJECTIVES** Detection of anticardiolipin antibodies (ACA) in cryoglobulins of patients with the HCV infection before and after dissociation of immune complexes.

**PATIENTS AND METHODS** Sera and cryoglobulins of 27 patients (19 female, 8 male) with chronic hepatitis C and with cryoglobulinemia were tested.

**RESULTS** ACA were searched in serum and cryoprecipitate of 27 HCV infected patients with cryoglobulinemia – before and after dissociation of immune complexes. The presence of ACA was not confirmed in sera, but in 59% of cases they were detected in dissociated complexes from cryoprecipitate. The correlation between the presence of anti-HCV antibodies and ACA in cryoprecipitate before dissociation of immune complexes was 0.47 ( $p < 0.01$ ) and after dissociation – 0.61 ( $p = 0.0007$ ). There was a statistically significant correlation between the presence of purpura (vasculitis) and the presence of ACA before ( $p < 0.002$ ) and after dissociation of complexes ( $p < 0.05$ ).

**CONCLUSIONS** In the tested group of patients there was a high incidence of ACA (non detectable in sera) detectable after dissociation of immune complexes from cryoglobulins. The presence of ACA in cryoprecipitate is significantly connected with clinical signs of cutaneous vasculitis.

## Correspondence to:

Joanna Jabłońska, MD, PhD  
Klinika Hepatologii i Nabytych  
Niedoborów Immunologicznych,  
Uniwersytet Medyczny,  
ul. Wolska 37, 01-201 Warszawa,  
Poland, phone: +48-22-335-53-40,  
fax: +48-22-631-05-35,  
e-mail: joannaj108@hotmail.com  
Pol Arch Med. Wewn. 2008;  
118 (Suppl): 20-24  
Copyright by Medycyna Praktyczna,  
Kraków 2008