

УДК 616.36-002:616-07

ПРОБЛЕМЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ У ПОЖИЛЫХ ПАЦИЕНТОВ: СЫВОРОТОЧНАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ α -ФЕТОПРОТЕИНА ПРИ НЕОПРЕДЕЛЕННОМ РЕЗУЛЬТАТЕ ИССЛЕДОВАНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГЕПАТИТА С

¹Потапова А.А., ²Ковальчук Л.В.¹Кожно-венерологический клинический диспансер №1 ДЗ;²ГОУ ВПО «Российский государственный медицинский университет Росздрава»
Москва, e-mail: aapotarova@mail.ru

В образцах сыворотки крови пожилых пациентов с положительным, отрицательным и неопределенным результатом исследования в иммуноферментных тест-системах планшетного формата с отдельным определением антител к структурным (Core) и неструктурным (NS3, NS4, NS5) антигенам вируса гепатита С была исследована концентрация α -фетопротеина (АФП). Показано, что концентрация АФП повышена в пробах, содержащих антитела высокой оптической плотности к структурным и неструктурным антигенам ВГС, по сравнению с концентрацией АФП в пробах, результаты исследования которых в иммуноферментных тест-системах были противоречивыми и неопределенными, а также в пробах с антителами к ВГС низкой оптической плотности. В образцах сыворотки крови пожилых людей без антител к ВГС наблюдались значительные колебания концентрации АФП. Таким образом, в лабораторной диагностике гепатита С необходима комплексная оценка серологических и биохимических маркеров ВГС-инфекции с учетом возрастной категории пациента.

Ключевые слова: антитела к вирусу гепатита С; иммуноферментный анализ; неопределенные результаты; α -фетопротеин; пожилые пациенты

Выявление антител к вирусу гепатита С (анти-ВГС) в крови пациентов методом иммуноферментного анализа (ИФА), которое является первым шагом лабораторной диагностики ВГС-инфекции, наиболее эффективно при обследовании людей без иммунодефицитного состояния в фазу развернутой продукции антител. На раннем этапе заражения ВГС и после выздоровления [8], а также при патологических и физиологических, в частности, возрастных, иммунодефицитных состояниях результаты исследования анти-ВГС в ИФА могут быть позитивными, но с низкой оптической плотностью, или противоречивыми [6]. В то же время вследствие широкого распространения и социальной значимости ВГС-инфекции необходимость в правильной интерпретации результатов исследования возникает уже на

этапе первичного скрининга. Развитие гепатита С сопровождается определенными биохимическими изменениями сыворотки крови, в частности, увеличением концентрации аланинаминотрансферазы и α -фетопротеина (АФП) [3, 9]. Некоторые из биохимических маркеров повреждения печени могут быть обнаружены в сыворотке крови с неопределенным результатом исследования анти-ВГС в иммуноблоте [5]. В РФ в качестве подтверждающих тест-систем используются не только иммуноблоты, но и тест-системы для ИФА (ИФТС) в планшетном формате с отдельным определением антител к ряду антигенов ВГС. Относительно биохимической характеристики сыворотки крови с неопределенным результатом исследования анти-ВГС в планшетных ИФТС в литературе имеются единичные данные [5].

Целью представленной работы было определение концентрации α -фетопротеина в сыворотке крови пациентов пожилого возраста с различным, в том числе неопределенным, результатом исследования анти-ВГС в подтверждающих тест-системах планшетного формата с раздельным определением антител к антигенам ВГС.

Материалы и методы

Результаты были получены при исследовании 82 образцов сыворотки крови пожилых людей, направленных на определение наличия в них маркеров вирусных гепатитов.

Определение анти-ВГС проводилось с помощью лицензированных ИФТС по двухэтапной схеме [4]. На первом этапе (при скрининге) была использована ИФТС «ВекторБест-анти-ВГС» (ЗАО «ВекторБест», г.Новосибирск) с комплексной сорбцией антигенов ВГС. На втором этапе (при подтверждении) были использованы две ИФТС с раздельной сорбцией Core и NS антигенов: «РекомбиБест анти-ВГС-подтверждающий тест» (ЗАО «ВекторБест», г. Новосибирск) и «ДС-ИФА-Анти-НСV-спектр GM», комплект 4 (ООО НПО «Диагностические системы», г. Н.-Новгород).

Позитивные образцы с низкой оптической плотностью в скрининге и в подтверждающей ИФТС согласно ранее разработанному алгоритму [7] были дополнительно исследованы в двух ИФТС с раздельной сорбцией четырех антигенов ВГС (Core, NS3, NS4 и NS5): «ДС-ИФА-Анти-НСV-спектр GM», комплект 2, и ВекторБест-анти-ВГС-подтверждающий тест» (ЗАО «ВекторБест»), а также в линейном иммуноферментном анализе (ЛИА) «INNO-LIA HCV Ab III update» («Innogenetics», Бельгия). Определение avidности антител проводили с использованием ИФТС «ДС-ИФА-АНТИ-НСV-АВИДНОСТЬ», серия 3 (ООО НПО «Диагностические системы»). Для определения концентрации АФП был использован набор реа-

гентов «АФП-ИФА-Бест-400-стрип» (ЗАО «Вектор-Бест»).

Значение коэффициента позитивности (КП) рассчитывали по отношению величины ОП контрольного образца к ОПкр. Статистическую обработку результатов проводили с помощью двух компьютерных программ: «Excel» и «Биостатистика» [1].

Полученные результаты

После исследования в образцах сыворотки крови наличия анти-ВГС были выделены следующие группы:

1) при отсутствии анти-ВГС в скрининговой тест-системе образцы были признаны не содержащими анти-ВГС (группа Анти-ВГС-);

2) при выявлении в первичной скрининговой и в подтверждающей тест-системе анти-ВГС с высокой оптической плотностью (ОП не менее 2,0, КП не менее 8) образцы были признаны анти-ВГС-содержащими (группа Анти-ВГС+).

Следующие две группы были выделены при дальнейшем исследовании позитивных образцов с низкой ОП в ИФТС для первичного скрининга (ОП менее 1,4, КП менее 5), а именно:

3) при выявлении анти-ВГС с низкой ОП и соответственно с низким КП в двух подтверждающих ИФТС разных производителей и определения низкой или высокой avidности анти-ВГС образцы признавались анти-ВГС-низкопозитивными (группа Анти-ВГС низк+);

4) при выявлении анти-ВГС только в одной из двух подтверждающих ТС либо при выявлении анти-ВГС в двух подтверждающих ТС разных производителей, но при отсутствии положительного результата в ЛИА и при определении avidности анти-ВГС, результат исследования анти-ВГС рассматривался как неопределенный в ИФТС, но отрицательный в ЛИА (группа Анти-ВГС но/-).

Группу Анти-ВГС- составили 16 образцов сыворотки крови пациентов (средний возраст $74,5 \pm 7,45$ лет), у которых отсутствовали указания на факторы высо-

кого риска инфицирования ВГС. В группе анти-ВГС средняя величина концентрации АФП составляла 8,25 МЕ/мл (от 3,741 до 29,71 МЕ/мл, $\sigma = 6,266$ МЕ/мл).

Группу Анти-ВГС+ составили 30 образцов (средний возраст пациентов $73,6 \pm 5,5$ лет). Образец №8 был получен от пациента с заболеванием печени, образец №22 – от пациента с наркоманией. В 28 из 30 образцов в подтверждающей ТС были обнаружены анти-Core и анти-NS ВГС с ОП в первичной и подтверждающей ИФТС не менее 2, КП не менее 8. В образце №18 определялись только анти-Core с ОП 2,0 и КП 8,0, в образце №7 определялись только анти-NS с ОП 2,7 и КП 10,8. Во всех образцах данной группы анти-ВГС были высокоавидными. Средняя концентрация АФП в группе Анти-ВГС+ составляла 14,725 МЕ/мл (интервал от 3,804 до 111,815 МЕ/мл, $\sigma = 22,02$ МЕ/мл).

В группу Анти-ВГСнизк+ (11 образцов, средний возраст пациентов $71,5 \pm 6,4$ года) образцы были отобраны согласно ранее разработанному алгоритму: либо при обнаружении только анти-Core с КП менее 2; либо при обнаружении только анти-NS ВГС (табл. 1). Средняя величина КП анти-NS в каждой ИФТС не превышала 5, однако КП анти-NS в разных ИФТС могли отличаться (образец №2). В 8 из 11 образцов авидность анти-ВГС была высокой, в трех – низкой. В 6 из 11 образцов были обнаружены только высоко- или низкоавидные анти-NS4 ВГС. Указаний на наличие факторов высокого риска инфицирования ВГС не было ни у одного пациента. Среднее значение концентрации АФП в группе анти-ВГСнизк+ было равно 7,045 МЕ/мл (от 4,06 до 24,06 МЕ/мл; $\sigma = 5,773$ МЕ/мл).

Результаты исследования 25 образцов (средний возраст пациентов $75,4 \pm 7,0$ лет) в ИФТС планшетного формата были противоречивыми (табл. 2). Из 25 образцов в двух (№3 и №18) были обнаружены высокоавидные анти-ВГС, в шести образцах (№№ 1, 2, 6, 9, 16, 19) авидность анти-ВГС была низкой. Все вышеперечисленные образцы

в ИФТС другого производителя и в ЛИА были определены как анти-ВГС-негативные (группа Анти-ВГСно/–). Средняя величина концентрации АФП в образцах Анти-ВГСно/– была равна 11,187 МЕ/мл (от 2,941 до 83,16 МЕ/мл, $\sigma = 16,642$ МЕ/мл).

При сравнении сывороточной концентрации АФП по критерию Манна-Уитни было обнаружено, что группа образцов, не содержащих анти-ВГС, не отличается ни от одной из исследованных групп. Различия по концентрации АФП были обнаружены:

- 1) между группами Анти-ВГС+ и Анти-ВГСнизк+ ($p = 0,024$);
- 2) между группами Анти-ВГС+ и Анти-ВГСно/– ($p = 0,045$).

Обсуждение и заключение

У пациентов пожилого возраста в г. Москве инфицирование вирусом гепатита С является наиболее частой причиной хронического гепатита (69,3% больных) [2]. При инфицировании ВГС в возрасте старше 50 лет цирроз печени формируется вдвое быстрее, чем у лиц, инфицированных до 50 лет. Осложнения ВГС-инфекции выявляются у пожилых в основном в далеко зашедших формах вследствие того, что длительная бессимптомная персистенция вируса и стертые клинические проявления заболевания приводят к позднему обращению больных к врачу [2]. Повышение специфичности лабораторной диагностики ВГС-инфекции как на раннем этапе инфицирования, так и при возрастной недостаточности иммунного ответа возможно при расширенных исследованиях анти-ВГС-положительных образцов с низкой ОП в ИФА. Сравнивая результаты исследования проб пожилых людей с ранее полученными результатами исследования проб молодых мужчин [5], можно отметить следующее. Из общего количества образцов с неопределенными результатами исследования в ИФТС положительными при дальнейшем исследовании признается не более 1/3 как в группе молодых мужчин, так и людей старше 65 лет. Различия между группами проявились, во-первых, в спектре выявляемых

Таблица 1

Концентрация α -фетопroteина в образцах сыворотки крови пожилых людей, содержащих высоко- и низкоавидные анти-ВГС (соответственно ВА и НА) с низким коэффициентом позитивности (значение КП указано).
ИФТС1 («РекомбиБест анти-ВГС-подтверждающий тест») и ИФТС2 («ДС-ИФА-Анти-НСV-спектр GM» комплект 4) – подтверждающие тест-системы с раздельным определением анти-Core и анти-NS ВГС.
ИФТС3 («ДС-ИФА-Анти-НСV-спектр GM» комплект 2) – подтверждающая тест-система с раздельным определением анти-Core, анти-NS3, анти-NS4, анти-NS5 ВГС

№ п/п	Пол	Возраст, полных лет	ИФТС1		ИФТС2		ИФТС3	Авидность анти-ВГС	АФП (МЕ/мл)
			анти-Core	анти-Core	анти-Core,	анти-NS			
1	ж	67	–	3,83	1,92	4,95	анти-NS3, анти-NS4, анти-NS5	ВА	4,062
2	ж	60	–	8,49	–	1,64	анти- NS4	ВА	4,525
3	м	82	–	4,97	–	2,93	анти- NS4	ВА	4,259
4	ж	69	–	5,43	–	3,03	анти-NS3, анти-NS5	НА	5,139
5	ж	71	–	3,1	–	1,16	анти-NS4	ВА	6,58
6	м	69	–	2,39	–	1,72	анти-NS4	НА	4,458
7	м	75	1,33	1,8	–	2,27	анти-Core, анти-NS	ВА	7,802
8	ж	69	–	1,16	–	3,09	анти-NS4	ВА	4,458
9	ж	82	–	5,18	–	3,05	анти-NS4	ВА	6,805
10	ж	67	–	3,11	–	1,15	анти-NS4	НА	24,062
11	м	76	2,41	–	2,71	3,72	анти-Core, анти-NS	ВА	5,349
Среднее		71,5	1,87	3,95	1,92	2,61			7,045
σ		6,4	-	2,15	-	1,16			5,773
Медиана		69	-	3,47	-	2,93			5,139
Min-max		60-82	-	1,16-8,49	-	1,15-4,95			4,062-24,062

антител. В пробах, полученных от пожилых людей, в ИФТС с низкой ОП могли определяться анти-NS3, -NS4 и -NS5 раздельно и в различных сочетаниях; в ИБ/ЛИА наличие анти-ВГС в пробах данной подгруппы не подтверждалось. В пробах, полученных от молодых мужчин, практически во всех образцах с неопределенным результатом исследования анти-ВГС в ИФТС выявлялись только анти-NS4 ВГС; в дальнейших исследованиях в иммуноблоте наличие анти-ВГС не подтверждалось. Во-вторых, различие между группами выявилось по авидности антител: анти-NS4 у пожилых пациентов

могли быть как высоко-, так и низкоавидными, а при обнаружении в пробе молодого пациента только анти-NS4 авидность антител не определялась. В-третьих, согласно нашим данным, изменение концентрации АФП в зависимости от результата тестирования анти-ВГС (позитивного, негативного и неопределенного) в группах проб молодых и пожилых пациентов было различным. Концентрация АФП в анти-ВГС-негативных образцах сыворотки крови молодых мужчин была ниже, чем в анти-ВГС-позитивных образцах и в образцах с неопределенными в ИФТС и неопределенными в иммуноблоте результатами.

Таблица 2

Концентрация α-фетопротеина в образцах сыворотки крови пожилых людей с неопределенным результатом исследования анти-ВГС в ИФТС и отрицательным в ЛИА. *ИФТС1, ИФТС2, ИФТС3–см. в табл. 1. **Авидность: ВА – высокая, НА – низкая, НО – не определяется

№ п/п	Пол	Возраст (лет)	ИФТС1*		ИФТС2*		ИФТС3*	Авидность анти-ВГС в образце**	АФП (МЕ/мл)
			анти-Core	анти-NS	анти-Core	анти-NS			
1		72	–	–	–	1,54*	Анти-NS3,4,5	НА	3,933
2	ж	85	–	–	2,45	3,08	Анти-Core, анти-NS3,4,5	НА	21,211
3	ж	84	–	–	–	3,07	Анти-NS3,4,5	ВА	4,127
4	ж	79	–	–	–	1,40	Анти-NS3,4,5	НО	4,659
5	м	70	1,34	8,47	–	4,44	Анти-NS3,4,5	НО	4,127
6	ж	75	–	–	–	2,89	Анти-NS4,5	НА	6,58
7	ж	74	–	–	–	1,00	Анти-NS4,5	НО	5,139
8	ж	70	–	–	–	1,19	Анти-NS3,4	НО	2,941
9	ж	82	–	–	–	2,22	Анти-NS3,4,5	НА	5,992
10	ж	93	–	2,36	–	2,52	Анти-NS3,4,5	НО	83,16
11	м	67	–	–	–	1,81	Анти-NS4	НО	6,358
12	ж	71	–	–	–	1,48	Анти-NS3,4,5	НО	7,184
13	м	79	–	1,67	–	1,35	Анти-NS3,4,5	НО	4,727
14	ж	73	–	1,39	–	1,60	Анти-NS5 5	НО	3,997
15	м	81	–	–	–	3,70	Анти-NS5	НО	5,07
16	ж	74	–	–	1,78	2,93	Анти-Core, анти-NS3,4,5	НА	23,42
17	ж	68	–	1,61	–	–	Анти-NS3,4,5	НО	4,795
18	ж	77	–	–	–	3,33	Анти-NS3,4,5	ВА	7,031
19	ж	69	–	–	–	7,04	Анти-NS3,5	НА	4,062
20	м	79	–	–	1,49	3,05	–	НО	5,419
21	м	84	–	3,76	–	1,66	–	НО	11,357
22	ж	69	–	2,68	6,00	2,23	–	НО	6,137
23	ж	71	–	8,91	–	3,13	–	НО	4,795
24	ж	62	–	7,00	–	1,45	–	НО	33,305
25	ж	77	–	–	4,96	1,84	–	НО	10,159
Среднее		75,4	1,34	4,21	3,34	2,5			11,187
σ		7,0	–	3,06	2,02	1,32			16,642
Медиана		74	–	2,68	2,45	2,23			5,419
Min-max		62-93	–	1,61-8,91	1,49-6,0	1-7,04			2,941-83,16

В двух последних подгруппах концентрация АФП не различалась [5], что подтверждает вывод Rios [10] об эпидемиологической близости групп с анти-ВГС-позитивными и неопределенными результатами. В отличие от этого, группа образцов пожилых людей с отрицательными результатами тестирования анти-ВГС была крайне гетерогенной по концентрации АФП, по-видимому, вследствие разнообразных приобретенных заболеваний и наличия иных, кроме ВГС, гепатотоксических факторов, вследствие чего не отличалась ни от одной из исследованных групп по концентрации АФП. Отмеченное превышение сывороточной концентрации АФП в анти-ВГС-высокопозитивных образцах над концентрацией АФП в анти-ВГС-низкопозитивных образцах может быть обусловлено длительностью инфекционного процесса, в течение которого наиболее выраженное повышение уровня АФП наблюдается на стадии тяжелого фиброза с последующим снижением при трансформации в цирроз печени (частом осложнении хронического гепатита С у пожилых людей) [3]. Кроме того, в низкопозитивных на наличие анти-ВГС-образцах отсутствие подъема концентрации АФП может быть обусловлено начальным этапом инфекционного процесса (с анти-ВГС низкой авидности) либо выздоровлением (с остаточными анти-ВГС высокой авидности) с нормализацией биохимических показателей. Образцы с противоречивыми в ИФТС, но отрицательными в иммуноблоте и в тесте на авидность результатами, по-видимому, проявляли в ИФТС ложную позитивность.

В заключение следует отметить, что, в отличие от молодых мужчин, в группе пожилых людей повышенная концентрация АФП не может служить дополнительным критерием, позволяющим рассматривать группу с неопределенными в ИФТС результатами как группу, эпидемиологически близкую к группе с анти-ВГС-позитивными результатами. Таким образом, в лабораторной диагностике гепатита С необходима комплексная оценка серологических и биохимических маркеров

ВГС-инфекции с учетом возрастной категории пациента.

Список литературы

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 321 с.
2. Дьякова И.П. Особенности клинической картины и лечения HCV-инфекции у пожилых: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2005. – 26 с.
3. Клиническое значение онкологических маркеров при хроническом гепатите С / Ю.В. Лобзин, К.В. Жданов, Д.А. Гусев, В.Л. Пастушенков, А.В. Шкуро // Медицинский академический журнал. – 2005. – №1. – С. 67–73.
4. О применении в практике здравоохранения иммуноферментных тест-систем для выявления поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) и антител к вирусу гепатита С (анти-ВГС) в сыворотке крови человека. Приказ МЗ РФ № 322 от 21.10.2002.
5. Потапова А.А. Концентрация альфа-фетопротейна в сыворотке крови с неопределенным результатом исследования антител к вирусу гепатита С в иммуноферментном анализе // Росс. иммунол. журнал. – 2010. – Т. 4, №13. – С. 173–181.
6. Возрастной аспект лабораторной диагностики вирусного гепатита С / А.А. Потапова, П.Г. Богущ, Е.Б. Редченко, Э.Ю. Сариди, Е.Ю. Варламова. // Клиническая геронтология. – 2006. – Т. 12, №3. – С. 41–45.
7. Потапова А. А., Редченко Е. Б., Науменко В.А. Алгоритм исследования «проблемных» образцов при массовом скрининге сыворотки крови на антитела к вирусу гепатита С // Мир вирусных гепатитов. – 2008. – №4. – С. 8–12.
8. Alter M.J., Kuhnert W.L., Finelli L. Laboratory Testing and Result Reporting of Antibody to Hepatitis C Virus Guidelines for Laboratory Testing and Result Reporting of Antibody to Hepatitis C Virus // MMWR Recomm. Rep. – 2003. – Vol. 52 (RR-3). – P. 1–13.
9. Caspari G., Gerlich W.H., Beyer J., Schmitt H. Non-specific and specific anti-HCV results correlated to age, sex, transaminase, rhesus blood group and follow-up in blood donors // Arch. Virol. – 1997. – Vol. 142, №3. – P. 473–489.
10. Rios M., Diago M., Rivera P., Tuset C., Cors R. et al. Epidemiological, biological and histological characterization of patients with indeterminate third-generation recombinant immunoblot assay antibody results for hepatitis C virus // J. Viral. Hepat.. – 2006. – Vol. 13, №3. – P. 177–181.

Рецензенты:

Захарова Л.А., д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории гистогенеза Учреждения РАН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова, Москва;

Козлов И.Г., д.м.н. профессор, зав. кафедрой фармакологии ГОУ ВПО «Российский государственный медицинский университет Росздрава», Москва.

LABORATORY DIAGNOSTICS PROBLEMS IN SENIOR PATIENTS: A –FETOPROTEIN LEVEL IN BLOOD SERA WITH INDETERMINATE RESULTS OF ANTIBODIES TO VIRUS HEPATITIS C TESTING

¹Potapova A.A., ²Kovalchuk L.V.

¹*Dermatovenerologic Clinical Dispensary №1;*

²*Russian State Medical University, Moscow,*

e-mail: aapotapova@mail.ru

Serum α -fetoprotein (AFP) level was investigated in sera samples of senior patients with positive, negative and indeterminate results in the microplate enzyme immunoassay (EIA) with separate testing of antibodies to structural (Core) and non-structural (NS3, NS4, NS5) hepatitis C virus (anti-HCV) antigens. The AFP concentration was found to be increased in positive samples with anti-HCV high optical density compared with the AFP concentration in the anti-HCV low optical density samples and in the samples with the EIA indeterminate and discordant results. In the sera samples from senior patients without anti-HCV the AFP level varied in large interval. Thus, the complex estimation of viral infection specific markers as well as biochemical markers of liver damage should be included in the laboratory diagnostics of hepatitis C with taking in attention the aging patient category.

Keywords: antibodies to hepatitis C virus; enzyme immunoassay; indeterminate results; α -fetoprotein; senior patients