Возрастной аспект изменения сывороточной концентрации альфа-фетопротеина при неопределенном результате исследования антител к вирусу гепатита С

Н.Н. ПОТЕКАЕВ, А.А. ПОТАПОВА[1], В.А. НАУМЕНКО

Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии

Age-specific changes of serum alpha-fetoprotein levels in the subjects with inconclusive results of the detection of antibodies against hepatitis C virus

N.N. POTEKAEV, A.A. POTAPOVA, V.A. NAUMENKO

Moscow center of dermatovenerology and cosmetology

Цель представленной работы — изучение изменения концентрации альфа-фетопротеина (АФП) в сыворотке крови молодых и пожилых людей с неопределенными результатами исследования анти-ВГС в подтверждающих тест-системах для иммуноферментного анализа (ИФА) планшетного формата с раздельным определением антител к Core, NS3, NS4 и NS5 протеинам ВГС. Обнаружено, что в анти-ВГС-позитивных с высокой оптической плотностью в ИФА образцах сыворотки крови молодых мужчин концентрация АФП выше, чем в анти-ВГС-негативных образцах (12,57 и 4,37 МЕ/мл соответственно, p=0,045). В образцах с неопределенным результатом в планшетных тест-системах для ИФА и неотрицательным результатом в иммуноблоте, содержащих в основном антитела к Core и к NS3 протеинам ВГС, концентрация АФП (7,41 МЕ/мл) была также выше, чем в образцах, анти-ВГС-негативных в иммуноферментных тест-системах планшетного характера (p=0,008). Среди аналогичных групп пожилых пациентов подобных закономерностей не обнаружено, что свидетельствует о необходимости комплексной оценки серологических и биохимических маркеров ВГС-инфекции с учетом возрастной категории пациента.

Ключевые слова: антитела к вирусу гепатита С, неопределенный результат, альфа-фетопротеин.

The objective of the present work was to study the changes of the serum alpha-fetoprotein (AFP) levels in young and elderly subjects presenting with inconclusive results of the measurement of antibodies against hepatitis C virus (anti-HCV) with the use of a certified immunoenzyme assay (IEA) tray system allowing for the separate detection of anti-Core, anti-NS3, anti-NS4, and anti-NS5 HCV protein antibodies. It was shown that anti-HCV positive sera of high optical density obtained from the young men contained higher AFP concentrations than anti-HCV negative sera (125.57 and 4.37 IU/ml respectively; p=0.045). The level of AFP (7.41 IU/ml) in the sera containing largely anti-Core and anti-NS3 HCV protein antibodies that yielded inconclusive results when studied in the IEA tray system and non-negative results in the immunoblot test was also higher than in the anti-HCV negative sera studied in the same system (p=0.008). Similar differences were not documented in the groups of elderly subjects. The results of the study suggest the necessity of comprehensive evaluation of serological and biochemical markers of HCV infection taking into consideration the age of the individual patients.

Key words: antibodies against hepatitis C virus, inconclusive results, alpha-fetoprotein.

Основными путями заражения вирусом гепатита С (ВГС) признаны совместное использование игл и шприцев при внутривенном введение наркотиков, переливание зараженной крови и ее продуктов, оперативные вмешательства и косметические процедуры, связанные с нарушением целостности кожи, например, нанесение татуировок. Значимость полового пути передачи ВГС существенно меньше, однако о его реализации свидетельствуют, в частности, особенности внутрисемейного инфицирования: распространение антител к ВГС (анти-ВГС) среди родителей и детей инфицированных лиц примерно в 4 раза ниже, чем среди супругов (0,87, 0,79 и 3,39% соответственно) [1]. Повышение распространения анти-ВГС в среде гомосексуалистов и женщин, занятых в сфере сексуальных услуг [2], а также среди пациентов дерматовенерологических лечебных учреждений России и других стран, например, США

© Коллектив авторов, 2011

[1]e-mail: aapotapova@mail.ru

[3, 4], возможно, объясняется не только передачей вируса половым путем, но и наличием у этих контингентов дополнительных факторов высокого риска заражения (прием наркотиков и др.) [4]. Необходимость обследования пациентов с инфекциями, передаваемыми половым путем, на маркеры вирусного гепатита С (ГС) приобретает особое значение при наличии ВИЧ-инфекции и гепатита В, вследствие наличия ассоциаций между этими инфекциями и влияния микстинфицирования на клиническую картину, лечение и результат лабораторного исследования [5, 6].

Первым этапом лабораторной диагностики вирусного ГС является определение анти-ВГС в сыворотке крови пациента методом иммуноферментного анализа (ИФА). Кроме позитивного и негативного результата ИФА, в иммуноблотах (ИБ) и иммуноферментных тест-системах планшетного формата (плИФТС) с раздельным выявлением спектра антител возможен неопределенный результат исследования. В основном неопределенный результат характерен для образцов сыворотки крови с пограничной позитивной оптической плотностью (ОП) в скрининговых плИФТС [7]. Для решения вопроса о причине неопределенного результата необходимы дополнительные лабораторные исследования, в первую очередь поиск специфических (РНК ВГС) и неспецифических серологических маркеров ГС. Известно, что сыворотка крови людей, инфицированных ВГС, характеризуется определенными изменениями биохимического профиля, в частности, увеличением концентрации альфа-фетопротеина (АФП) [8]. В отношении образцов с неопределенным результатом исследования подобные сведения в литературе единичны.

Цель работы — изучение изменения концентрации АФП в сыворотке крови молодых и пожилых людей с неопределенными результатами исследования анти-ВГС в подтверждающих плИФТС с раздельным определением антител к антигенам ВГС.

Материал и методы

Исследованы 65 образцов сыворотки крови мужчин моложе 60 лет и 82 образца сыворотки крови людей старше 60 лет, направленных в клинико-иммунологическую лабораторию по диагностике ВИЧ-инфекции Кожно-венерологического диспансера №1 Департамента здравоохранения Москвы, в которой проводится скрининг на маркеры вирусных гепатитов В и С.

Определение анти-ВГС проводилось по двухэтапной схеме [9] с помощью российских лицензированных плИФТС: ВекторБест-анти-ВГС (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) с комплексной сорбцией антигенов ВГС при первичном скрининге и двух плИФТС с раздельной сорбцией структурного (Core) и неструктурных антигенов (NS) ВГС при подтверждении позитивных результатов (РекомбиБест анти-ВГС-подтверждающий тест, ЗАО «Вектор-Бест», и ДС-ИФА-Анти-HCV-спектр GM, ООО НПО «Диагностические системы», Россия). Позитивные образцы с низкой ОП в скрининге (менее 3) и в обязательном подтверждении (КП Анти-Core менее 2, КП Анти-NS менее 6), согласно ранее разработанному алгоритму [10] были дополнительно исследованы в двух плИФТС с раздельной сорбцией четырех антигенов ВГС (Core, NS3, NS4 и NS5): ДС- ИФА-Анти-HCV-спектр GM и ВекторБест-анти-ВГС-подтверждающий тест, а также в ИБ RecomBlot HCV IgG 2.0 («Mikrogen», Германия) и в линейном иммуноферментном анализе (ЛИА) INNO-LIA HCV Ab III update («Innogenetics», Бельгия). Для определения концентрации АФП использовали набор реагентов АФП–ИФА–Бест–400–стрип (ЗАО «Вектор-Бест»).

Расчеты по определению критической ОП ($ОП_{кр}$) проводили в автоматическом режиме во время регистрации результатов анализа. Значение коэффициента позитивности (КП) рассчитывали по отношению величины ОП образца к $ОП_{кр}$. Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерных программ Excel и Биостатистика [11] для определения достоверности различий групп с помощью непараметрического критерия Манна—Уитни.

Результаты

В результате исследования образцов сыворотки крови молодых мужчин (возраст 17—60 лет, средний возраст 33,6±12,9 года) были выделены следующие группы:

1) образцы (n=18) без анти-ВГС на первом этапе скрининга (Анти-$ВГС^{-}$);

2) образцы (n=20) с высоким КП (более 6) как на этапе первичного скрининга, так и на этапе обязательного подтверждения (Анти-ВГС);

3) образцы (n=7) с низким КП в скрининге (менее 3) и в обязательном подтверждении, результат исследования которых в плИФТС с расширенным спектром определяемых антител был неопределенным; в дополнительных исследованиях в ИБ или в ЛИА — неопределенным или позитивным (Анти-ВГС:$ИБ_{неопр}/^{+}$);

4) образцы (n=19) с неопределенным результатом исследования в ИФТС; признанные анти-ВГС-отрицательными (Анти-ВГС:$ИБ^{-}$) в дополнительных исследованиях в ИБ или в ЛИА данные образцы.

По составу определяемых в ИФТС антител между группами наблюдались следующие различия. Из 20 образцов группы Анти-$ВГС^{+}$ в 18 образцах обнаружены анти-Core и анти-NS ВГС с КП более 6, в 2 образцах — только анти-Core ВГС с КП более 4.

В 7 образцах Анти-ВГС:ИБ$_{неопр}$/$^{+}$ выявлялись антитела только к одному антигену ВГС; в 3 образцах это были анти-Core, в 3 других — анти-NS3; в одном образце — анти-NS4. В образцах Анти-ВГС:ИБ$^{-}$, как правило, в ИФТС выявлялись антитела только к одному антигену ВГС; в 17 из 19 образцов это были анти-NS4 (89%), в одном — анти-NS5 (5%). В одном образце Анти-ВГС:ИБ$^{-}$ были обнаружены антитела к NS4 и к NS5 антигенам с ОП в так называемой серой зоне (ниже ОП критической на 15%).

Данные о концентрации АФП в группах сыворотки крови молодых мужчин с разными результатамм исследования анти-ВГС представлены в таблице.

Обнаружено, что по концентрации АФП различаются следующие группы. Во-первых, в образцах Анти-ВГС$^{+}$ концентрация АФП выше, чем в образцах Анти-ВГС$^{-}$ (p=0,036). Во-вторых, в образцах с неопределенным результатом исследования в плИФТС и неотрицательным (положительным и неопределенным) результатом исследования в ИБ (Анти-ВГС:ИБ$_{неопр}$/$^{низк+}$) концентрация АФП была также выше, чем в образцах Анти-ВГС$^{-}$ (p=0,008). Между остальными группами образцов, полученных от молодых мужчин, различий по концентрации АФП не обнаружено.

При исследовании анти-ВГС в образцах сыворотки крови людей старше 60 лет (от 60 до 93 лет, средний возраст 74±6,5 года) были выделены группы, аналогичные группам образцов сыворотки крови молодых мужчин: Анти-ВГС$^{-}$ (n=16), Анти-ВГС$^{+}$ (n=30), Анти-ВГС:ИБ$_{неопр}$/$^{+}$ (n=11), Анти-ВГС:ИБ$^{-}$ (n=25). По спектру выявляемых антител между группами пожилых пациентов обнаружены следующие различия. В 7 из 11 образцов группы Анти-ВГС:ИБ$_{неопр}$/$^{+}$ в плИФТС с расширенным спектром определения анти-ВГС выявлялись с низким КП антитела только к одному антигену, в 4 образцах — антитела к 2–3 антигенам ВГС. В группе Анти-ВГС:ИБ$^{-}$ результат исследования как анти-Core, так и анти-NS, в подтверждающих ИФТС разных производителей был противоречивым (позитивным и негативным). В группе Анти-ВГС:ИБ$^{-}$ в плИФТС с раздельным определением анти-Core, анти-NS3, анти-NS4 и анти-NS5 в 16 из 25 образцов (64%) определялись антитела к трем антигенам ВГС. Концентрация АФП в группах с разными результатами тестирования анти-ВГС была следующей: в группе Анти-ВГС$^{-}$ — 8,24 МЕ/мл (3,74—29,71 МЕ/мл), в группе Анти-ВГС$^{+}$ — 14,73 МЕ/мл (3,8—111,82 МЕ/мл), в группе Анти-ВГС:ИБ$_{неопр}$/$^{+}$ — 7,05 МЕ/мл (4,06—24,06 МЕ/мл), в группе Анти-ВГС:ИБ$^{-}$ — 11,19 МЕ/мл (2,94—83,16 МЕ/мл). В двух последних группах концентрация АФП была ниже, чем в группе Анти-ВГС$^{+}$ (p=0,024, p=0,045). Группа Анти-ВГС$^{-}$ по концентрации АФП не отличалась ни от одной из исследованных групп.

При сравнении концентрации АФП в разновозрастных группах обнаружено, что концентрация АФП в образцах сыворотки крови без анти-ВГС (Анти-ВГС$^{-}$) пожилых людей выше, чем в образцах сыворотки крови без анти-ВГС людей моложе 60 лет (p<0,004). Различий по концентрации АФП между другими аналогичными группами молодых и пожилых людей не обнаружено.

Обсуждение и выводы

Ранее было показано, что среди пациентов кожно-венерологических диспансеров г. Москвы анти-ВГС распространены достаточно широко (в 2004 г. обнаруживались у 8,18% обследованных) [3]. Примерно у 2,5% образцов, позитивных в первичном скрининге, при исследовании в подтверждающих тест-системах результат исследования оказывается неопределенным [10]. Неопределенный результат в плИФТС и в ИБ может быть как следствием неспецифической реакции (т.е. ложно-позитивным), так и свидетельствовать о наличии небольшого количества антител в раннем периоде инфицирования или при выздоровлении [7]. В большинстве случаев причина неопределенного результата остается неясной, а проведение во всех случаях дополнительного исследования в ИБ является чрезвычайно дорогостоящим. В представленной работе проведена оценка концентрации АФП, известного биохимического маркера повреждения печени, в образцах сыворотки крови с неопределенным результатом исследования анти-ВГС в плИФТС с широким спектром выявляемых антител к ВГС в качестве значительно более дешевых аналогов ИБ. Согласно полученным нами результатам, в образцах с неопределенными в плИФТС и неотрицательными в ИБ результатами (как правило, связанными с обнаруже-

Концентрация АФП в пробах сыворотки крови с разными результатами определения анти-ВГС, полученных от мужчин моложе 60 лет

Группа	n	Концентрация АФП, σ, МЕ/мл	Min—max концентрации АФП, МЕ/мл
Анти-ВГС$^{-}$	18	4,37 (σ=2,79)	1,07—13,04
Анти-ВГС$^{+}$	20	12,57* (σ=21,53)	1,07—96,05
Анти-ВГС:ИБ$_{неопр}$/$^{низк+}$	7	7,41** (σ=2,12)	4,73—10,81
Анти-ВГС ИБ$^{-}$	19	5,87 (σ=3,28)	0,72—13,68

Примечание. *n* – количество человек в группе. *p=0,045, **p=0,008 по сравнению с группой Анти-ВГС$^{-}$.

нием анти-NS3 или анти-Core), повышение концентрации АФП свидетельствует о наличии некоторого повреждения печени. В группе образцов молодых мужчин с неопределенными результатами, обусловленными выявлением только анти-NS4 в плИФТС, но отрицательными в ИБ, концентрация АФП не отличалась от нормы. По результатам длительного наблюдения за донорами крови с неопределенным результатом исследования в ИБ RIBA-3 был сделан вывод о том, что реактивность к С100, который является фрагментом NS4 протеина ВГС, — менее значимое свидетельство инфекции, чем реактивность к С33с (фрагменту NS3 протеина) или С22 (фрагменту Core протеина), и в большинстве случаев может быть расценена как неспецифическая реакция [12]. Вероятно, неспецифической реакцией объясняются результаты, полученные в плИФТС 1-го поколения, основанных на использовании С100 как единственного сорбента анти-ВГС: распространение анти-ВГС в среде гомосексуалов составляло 6,9% (в среде гетеросексуалов 1%, $p<0,0001$), а при использовании RIBA-2 — 2,2% и 0,4% соответственно ($p<0,02$) [5]. Таким образом, полученные нами данные о концентрации АФП в сыворотке крови молодых мужчин согласуются с выводом M. Rios и соавт. [13] об эпидемиологической близости группы с неопределенными результатами тестирования анти-ВГС к группе с анти-ВГС-позитивными результатами, но только в отношении группы с неопределенными результатами по наличию анти-NS3 или анти-Core, но не анти-NS4 ВГС. При инфицировании ВГС в возрасте старше 50 лет цирроз печени формируется в 2 раза быстрее, чем у лиц, инфицированных до 50 лет, а 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 [14]. В то же время для пожилых пациентов в большей мере, чем для молодых мужчин, характерны ложно-позитивные серологические реакции, что в нашем исследовании проявилось в выявлении в плИФТС антител к нескольким антигенам ВГС при отсутствии подтверждения наличие анти-ВГС в ИБ. В наших исследованиях в группе анти-ВГС-негативных образцов сыворотки крови пожилых людей концентрация АФП была выше, чем в аналогичной группе образцов сыворотки крови молодых мужчин, по-видимому, вследствие разнообразных приобретенных заболеваний и наличия других, кроме ВГС, гепатотоксических факторов у пожилых пациентов. Таким образом, в лабораторной диагностике ГС необходима комплексная оценка серологических и биохимических маркеров ВГС-инфекции с учетом возрастной категории пациента.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Hajiani E., Masjedizadeh R., Hashemi J. et al.* Hepatitis C virus transmission and its risk factors within families of patients infected with hepatitis C virus in southern Iran: Khuzestan. World J Gastroenterol 2006; 12: 43: 7025—7028.
2. *Ward H., Day S., Weber J.* Risk business: health and safety in the sex industry over a 9 year period. Sex Trans Infect 1999; 75: 5: 340—343.
3. *Богуш П.Г., Редченко Е.Б., Потапова А.А. и др.* Распространение антител к вирусу гепатита С среди различных групп риска в Москве. Клин дерматол и венерол 2004; 1: 19—21.
4. *Gunn R.A., Murray P.J., Brennan C.H. et al.* Evaluation of screening criteria to identify persons with hepatitis C virus infection among sexually transmitted disease clinic clients: results from the San Diego Viral Hepatitis Integration Project. Sex Transm Dis 2003; 30: 4: 340—344.
5. *Tedder R.S., Gilson R.J., Briggs M. et al.* Hepatitis C virus: evidence for sexual transmission. Br Med J 1991; 302: 6788: 1299—1302.
6. *Канестри В.Г.* Комбинированная противовирусная терапия хронического гепатита С у больных ВИЧ-инфекцией: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М 2001.
7. *Alter M.J., Kuhnert W.L., Finelli L.* Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. MMWR Recomm Rep 2003; 52: RR-3: 1—13.
8. *Лобзин Ю.В., Жданов К.В., Гусев Д.А. и др.* Клиническое значение онкологических маркеров при хроническом гепатите С. Мед акад журн 2005; 1: 67—73.
9. 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 21.10.02.
10. *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: 8—12.
11. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика. М 1999.
12. *Piro L., Solinas S., Luciani M. et al.* Prospective study of meaning of indeterminate results of the recombinant immunoblot assay for hepatitis C virus in blood donors. Blood Transfus. 2008; 6: 2: 107—111.
13. *Rios M., Diago M., Rivera P. 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; 13: 3: 177—181.
14. *Дьякова И.П.* Особенности клинической картины и лечения HCV-инфекции у пожилых: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М 2005.