

УДК: 616.36–002.14–07

ИНФОРМАТИВНОСТЬ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА В ДИАГНОСТИКЕ ВГС-ИНФЕКЦИИ

¹Матиевская Н. В. (*natamati@mail.ru*), ¹Пашковец А. В. (*hannapashkavets@gmail.com*),
²Стасюкевич А. К. (*hanna_stasiukevich@list.ru*), ³Малышко Н. Г. (*natagr@gmail.com*)

¹УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

²ГУ «Гродненский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»,
Гродно, Беларусь

³УЗ «Гродненская областная инфекционная клиническая больница», Беларусь

Цель работы: оценить информативность иммуноферментного анализа в диагностике ВГС-инфекции. Изучены показатели оптической плотности (ОП) сывороток крови при определении анти-ВГС методом ИФА 250 пациентов, не получавших противовирусную терапию гепатита С. Всем пациентам было выполнено определение РНК ВГС методом ПЦР. Установлено, что при ОП, равной 2,6 и более, диагностируется репликативная стадия ВГС-инфекции (РНК ВГС+), в то время как при ОП, равной или менее 0,7, исключается наличие репликативной стадии ВГС-инфекции (РНК-). Выводы: показатель ОП суммарных антител к ВГС в сыворотке крови может быть использован как дополнительный критерий диагностики ВГС-инфекции в условиях ограниченных возможностей проведения ПЦР.

Ключевые слова: ВГС; ИФА; антитела к ВГС, диагностика

В настоящее время вирусный гепатит С (ВГС) является актуальной проблемой здравоохранения во всем мире в связи с его широкой распространенностью среди трудоспособного населения. По мнению экспертов ВОЗ, ежегодно в мире инфицируются ВГС 3-4 млн человек. Общее количество хронически инфицированных ВГС составляет 130-170 млн человек. По прогнозной оценке экспертов CDC, в мире в последующие 5 лет ожидается увеличение количества инфицированных ВГС до 400-450 млн. Ежегодно от связанных с гепатитом С болезней печени умирает примерно 350 000 пациентов [4].

Официальный учет ВГС-инфекции в Республике Беларусь проводится по трем категориям: острый гепатит С (ГС), хронический ГС, «носительство анти-ВГС». В группу остро и хронического ГС относят пациентов с репликативной стадией ВГС-инфекции (РНК ВГС+), в то время как в группу «носительство анти-ВГС» должны относиться пациенты с наличием антител при отсутствии репликативной стадии ГС, подтвержденной отрицательным результатом на РНК ВГС [1, 2].

Репликативная стадия ВГС-инфекции свидетельствует о наличии острой или хронической ВГС-инфекции и диагностируется при наличии у пациента положительного результата на РНК ВГС. В то время как отсутствие РНК ВГС у анти-ВГС позитивного пациента говорит либо о спонтанной ремиссии ВГС-инфекции, что встречается в 10-15% случаев при естественном течении заболевания, либо о ремиссии в ответ на противовирусную терапию [2, 4].

Определение анти-ВГС проводится при помощи широко распространенного твердофазного иммуноферментного анализа, результат которого представлен антителами общего класса – anti-HCV total, которые содержат иммуноглобулины М и G. Верификация положительного результата ИФА базируется на показателе оптической плотности (ОП) сыворотки крови. ОП отражает уровень концентрации суммарных антител в одной единице объема. Положительный результат на определение антител к ВГС может свидетельствовать о наличии у пациента как репликативной стадии ВГС, так и персистенции антител после перенесенной острой или хронической ВГС-инфекции (ремиссия) [2].

Диагностика методом ПЦР у анти-ВГС позитивных лиц не всегда осуществима в связи с отсутствием возможности выполнения ПЦР на уровне многих районных центров, отказом части пациентов от данного исследования. В связи с этим, а также с учетом длительного часто пожизненного отсутствия клинико-биохимической активности ВГС-инфекции в группу «носителей» могут необоснованно попадать пациенты с репликативной стадией ВГС-инфекции. Подтверждением данного факта являются значимые различия в распределении пациентов с ВГС-инфекцией по категориям учета в РБ и регионах, в частности, в Гродненской области.

Материалы и методы

Изучены показатели оптической плотности (ОП) сывороток крови при определении суммарных анти-ВГС методом ИФА у пациентов, не получавших противовирусную терапию ВГС-инфекции. Среди них было 113 (45,2%) мужчин и 137 (54,8%) женщин, средний возраст мужчин 42,01±14,3 лет, средний возраст женщин - 41,26±16,6. Антитела к ВГС определялись методом твердофазного иммуноферментного анализа (тест-системы «Амплисенс», Вектор-Бест и другими зарегистрированными на территории Республики Беларусь). Выявление РНК ВГС проводилось качественным методом ПЦР («Амплисенс» и другими зарегистрированными на территории Республики Беларусь). Результаты представлены как среднее ± SD. Статистический анализ проводился с использованием пакета «Статистика» 6,0. Для получения диагностически значимых показателей количественных признаков использован метод построения ROC-кривых с расчетом площади под кривой (AUC), чувствительности и специфичности полученных моделей. Представлены данные официального статистического учета ГС в РБ и областях за 2014 – 2015 гг.

Результаты и обсуждение

Заболеваемость ГС в по регионам РБ за 2014 и 2015 гг. представлена на рисунке 1.

Как видно из рисунка 1, в 2015 г. распространенность впервые выявленного хронического ГС (ХГС) в РБ составила 31,5 на 100 тыс. населения, распространенность «носительства анти-ВГС» - 15,3, в то время как по регионам РБ распростра-

ненность данной патологии была неравномерной. В Гродненской области распространенность впервые выявленного ХГС составила 16,1 на 100 тыс. населения, «носительства анти-ВГС» - 34,5. Наиболее высокие показатели заболеваемости ХГС имеют место в г. Минске, Витебской и Минской областях, соответственно, в этих регионах наиболее низкие показатели «носительства анти-ВГС».

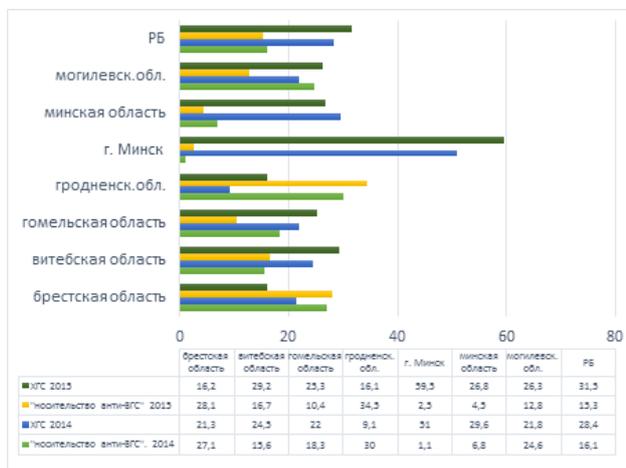


Рисунок 1. – Распространённость впервые установленного хронического ГС и «носительства анти-ВГС» на 100 тыс. населения в Республике Беларусь и по регионам (2014–2015 гг.)

В то же время количество «носителей анти-ВГС» в Гродненском регионе как в 2014, так и в 2015 гг. более чем в 2 раза превысило количество пациентов с ХГС. Очевидно, что в группе носителей находятся пациенты с хроническим ГС. Такое положение дел приводит к несвоевременной диагностике и лечению ГС, прогрессированию заболевания, формированию неблагоприятных исходов (цирроз печени, гепатоцеллюлярная карцинома) у данных пациентов.

Для оценки информативности ИФА в диагностике репликативной стадии ВГС-инфекции был выполнен сравнительный анализ показателей ОП сыворотки крови при положительных результатах ИФА в зависимости от результата качественной ПЦР на РНК ВГС. По результатам ПЦР РНК ВГС не выявлялась в 75 (30%) образцах плазмы крови. РНК ВГС была выявлена у 175 (70%). Уровень ОП у ВГС РНК-негативных был значительно ниже, чем у ВГС РНК-позитивных пациентов: $0,67 \pm 0,54 (0,007-2,579)$ и $2,7 \pm 0,65 (0,986 - 3,896)$, соответственно ($p < 0,001$). Установлена высоко достоверная прямая коррелятивная связь (корреляция Пирсона) между наличием РНК ВГС и уровнем показателя ОП - $0,834$ $p < 0,01$.

Для установления точек разделения ОП (cut-off point) для диагностики и исключения репликативной стадии ВГС-инфекции был проведен ROC-анализ. Установлена точка разделения ОП для исключения репликативной стадии ВГС-инфекции, равная 0,7 (с чувствительностью 97,7% и специфичностью – 92%), площадь поля под кривой ROC-анализа составила 0,981. Наилучшая точка разделения для подтверждения репликативной стадии ВГС-инфекции составила –2,6 (с чувствительностью 98,3% и специфичностью – 93,3%), площадь поля под кривой ROC-анализа – 0,987.

Распределение пациентов с учетом полученных показателей ОП представлено в таблице 1.

Таблица 1 - Распределение образцов сывороток в зависимости от уровня оптической плотности и результатов ПЦР

Показатель ОП	РНК-ВГС+ n=175	РНК-ВГС- n=75	p*
Меньше или равно 0,7	0	49 (65,3%)	<0,001
Больше 0,7 но меньше 2,6	71 (40,6%)	26 (33,7%)	>0,3
2,6 и более	104 (59,4%)	0	<0,001

* – тест χ^2

Как видно из представленной таблицы 1, среди РНК-ВГС+ пациентов в 59,4% случаев имела место высокая ОП (>2,6). У пациентов с таким уровнем ОП отсутствовали негативные результаты определения РНК. В то время как среди пациентов с негативными результатами на выявление РНК методом ПЦР в 65,3% случаев ОП была менее 0,7. Среди пациентов с РНК-ВГС+ уровень ОП менее 0,7 не был выявлен ни в одном случае, что подтверждает результаты ROC-анализа.

Группа пациентов с ОП более 0,7, но менее 2,6 была неоднородна по своему составу, так как в ней присутствовали пациенты как с наличием репликативной стадии ВГС (РНК-ВГС+) – 71 (40,6%), так и пациенты с отсутствием репликативной стадии ВГС (РНК-ВГС-) – 26 (33,75%). Представленные данные указывают на низкую информативность показателя ОП в пределах более 0,7, но менее 2,6 для диагностики или исключения репликативной стадии ВГС-инфекции.

Приводим клинические примеры, подтверждающие информативность представленных данных. Пациент Б., 43 г., диагноз: Хронический вирусный гепатит С, умеренной степени активности. Показатель ОП при определении анти-ВГС методом ИФА: 4,859 от 03.11.15. РНК-ВГС выделена от 12.11.2015. Таким образом, у данного пациента была диагностирована репликативная стадия ВГС-инфекции как по показателю ОП (уровень ОП >2,6), так и по результатам ПЦР-диагностики. Пациенту назначена противовирусная терапия ВГС-инфекции.

Пациент В., 38 л. Хронический гепатит С, ремиссия. Показатель ОП при определении анти-ВГС методом ИФА: от 07.12.15 составил 0,271. РНК-ВГС не выделена. У данного пациента была исключена репликативная стадия ВГС-инфекции как по показателю ОП (уровень ОП <0,7), так и по результатам ПЦР-диагностики. Находится под наблюдением.

Пациент Б., 35 л., диагноз: Хронический вирусный гепатит С, минимальной степени активности. Показатель ОП при определении анти-ВГС методом ИФА: 2,201 от 03.09.15 (уровень ОП больше 0,7, но меньше 2,6), что не позволило исключить или диагностировать репликативную стадию ВГС-инфекции методом ИФА. РНК-ВГС выделена от 10.09.2015, выставлен диагноз ХГС. Проведено обследование с целью установления стадии активности и хронизации ВГС-инфекции. Назначена противовирусная терапия ХГС.

Выводы

1. В настоящее время существуют значительные различия в регионах РБ по заболеваемости ХГС и распространённости «носительства анти-ВГС», что указывает на недостаточную диагностику ХГС у лиц с впервые выявленными антите-

лами к ВГС, отнесенных в группу «носительства антител к ВГС» в том числе в Гродненской области.

2. Показатель оптической плотности суммарных антител к ВГС в сыворотке крови информативен как дополнительный критерий верификации и исключения репликативной стадии ВГС-инфекции в условиях ограниченных возможностей проведения ПЦР, что позволит повысить точность диагностики и статистического учета форм ВГС-инфекции.

3. Показатель ОП, равный 2,6 и больше, при определении анти-ВГС методом ИФА позволяет диагностировать репликативную стадию ВГС-инфекции (с чувствительностью 98,3% и специфичностью – 93,3%), независимо от наличия или отсутствия у пациента клинико-биохимических признаков гепатита, отнести пациента в группу хронической ВГС-инфекции, рекомендовать дальнейшее дообследование с целью установления периода заболевания, стадии

активности и хронизации ВГС-инфекции, решения вопроса о необходимости противовирусной терапии ВГС.

4. Показатель ОП, равный 0,7 и меньше, при определении анти-ВГС методом ИФА позволяет исключить репликативную стадию ВГС-инфекции (с чувствительностью 97,7% и специфичностью – 92%), при отсутствии возможности определения РНК ВГС методом ПЦР, а также при отсутствии соответствующей клинической картины гепатита и отклонений в результатах стандартных биохимических исследований.

5. Показатель ОП в интервале от 0,7 до 2,6 при определении анти-ВГС методом ИФА не позволяет достоверно исключить или подтвердить репликативную стадию ВГС-инфекции, что требует обязательного проведения ПЦР-диагностики, учета клинико-лабораторных и инструментальных данных пациентов.

Литература

1. Матиевская, Н.В. Ко-инфекция ВИЧ/ВГС: этиология, эпидемиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение : монография / Н.В. Матиевская // Гродно : ГрГМУ, 2013.- 350с.
2. Егоров, А.М. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров [и др.] // – М.: Издательство высшая школа, 1991. С. 3-4.
3. Houghton, M. The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus. (англ.) // Journal of hepatology. – 2009. – Vol. 51, no. 5. – P. 939–948.
4. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep. 1998 Oct 16; 47(RR-19):1-39.

Literatura

1. Matievskaia N.V. Ko-infekcija VICH/VGS: yetiologija, yepidemiologija, patogenez, klinika, diagnostika, lechenie : monografija / N.V. Matievskaia //Grodno : GrGMU, 2013.- 350с.
2. Egorov, A.M. Teorija i praktika immunofermentnogo analiza / A.M. Egorov [i dr.] // – M.: Izdatel'stvo vysshaja shkola, 1991. S. 3-4.
3. Houghton M. The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus. (angl.) // Journal of hepatology. –2009. – Vol. 51, no. 5. – P. 939–948.
4. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep. 1998 Oct 16; 47(RR-19):1-39.

DESCRIPTIVENESS OF ENZYME-LINKED IMMUNOADSORBENT ASSAY IN DIAGNOSIS OF HCV-INFECTION

¹Matsiyuskaya N. V., ¹Pashkovets A. V., ²Stasyukevich A. K., ³Malyishko N. G.

¹Grodno State Medical University, Belarus, Grodno

²Grodno Regional Centre of Hygiene, Epidemiology and Public Health, Grodno, Belarus

³Grodno Regional Clinical Hospital of Infectious Diseases, Grodno, Belarus

Aim of study: to estimate descriptiveness of enzyme-linked immunoadsorbent assay (ELISA) in diagnosis of HCV-infection.

Methods. The optical density (OD) of total antibodies to HCV in the blood serum of 250 blood serum samples of anti-HCV-positive patients who did not receive antiviral therapy against HCV. All patients were tested on RNA HCV by PCR. Results are presented as mean \pm SD. *Results.* The OD 2,6 and more are associated with replicative stage of HCV-infection (RNA+), OD 0,7 and less is parameter for exclusion of replicative stage of HCV-infection (RNA-).

Conclusions. Parameter of serum OD may be used like additional criteria for diagnosis of HCV-infection especially in setting with limited recourses for PCR

Keywords: HCV; ELISA; Anti-HCV, diagnoses

Поступила: 02.09.2016

Отрецензирована: 06.09.2016