



Рогачева Т.А.¹, Грибок И.А.², Баюр Н.Г.¹, Анисько Л.А.^{1,2}✉

¹ Городская клиническая инфекционная больница, Минск, Беларусь

² Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Особенности реализации методологии иммунохимического определения альфа-фетопротеина на пути достижения диагностически значимых результатов его количественного определения

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция, сбор материала и дизайн исследования, написание текста – Рогачева Т.А.; сбор материала, обработка, написание текста – Грибок И.А.; сбор материала и дизайн исследования – Баюр Н.Г.; концепция, редактирование – Анисько Л.А.

Подана: 06.09.2023

Принята: 12.02.2024

Контакты: luidok@mail.ru

Резюме

Введение. Альфа-фетопротеин (АФП) – гликопротеин, который впервые был идентифицирован в сыворотке крови плода человека в 1956 г. и описан как онкофетальный антиген в 1964 г. Количественная оценка содержания АФП нашла широкое применение в онкологии и пренатальной диагностике. Определение концентрации АФП в динамике при онкопатологии имеет прогностическое значение для оценки эффективности проводимой терапии, риска рецидива опухолевого процесса, выживаемости пациентов. Отмечено, что повышение уровня АФП при заболеваниях печени доброкачественного характера чаще носит временный характер, в связи с чем ряд исследователей не рекомендуют использовать этот тест в качестве скринингового при онкопоиске. Однако в руководствах, изданных в странах Запада и Азии, не рекомендовано использовать тест определения АФП для диагностики гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) из-за его низкой диагностической чувствительности и диагностической специфичности, а его оптимальный диагностический порог для ГЦК к настоящему времени все еще остается спорным. Методом определения концентрации АФП является иммунохимический в различных его модификациях: иммуноферментный (ИФА), хемилюминесцентный, фермент-связанный флуоресцентный и другие.

Цель. Определить наиболее подходящую модификацию иммунохимического метода исследования для количественного определения АФП и оценить значимость данного лабораторного теста в скрининге ГЦК у пациентов с хроническим вирусным гепатитом.

Материалы и методы. В исследование включены 3048 пациентов с хроническим вирусным гепатитом, состоявших на амбулаторном учете консультативно-диагностического кабинета по вирусным гепатитам УЗ «Городская клиническая инфекционная



больница» г. Минска. Для количественной оценки АФП использовались следующие модификации иммунохимического анализа: иммуноферментный и иммунохемилюминесцентный анализ.

Результаты. Среди обследуемой группы пациентов методом ИФА был получен положительный результат (содержание АФП выше 15 МЕ/мл) в 15,2% образцов. Повторно взятые образцы крови у пациентов с высоким содержанием АФП (более 200–400 МЕ/мл и выше) исследовались в другой модификации иммунохимического анализа (иммунохемилюминесценция), и полученные результаты не совпадали с результатами ИФА, то есть не подтверждались, а уровни АФП, полученные в результате использования иммунохемилюминесценции, в большинстве случаев входили в референтные значения. При проведении одномоментного тестирования сывороток крови пациентов двумя различными модификациями иммунохимического анализа совпадение положительного результата исследования АФП наблюдалось лишь в 9,3% случаев, то есть более 90% повышенных уровней АФП при использовании ИФА не подтверждались в ИХЛ. Результаты исследования позволяют допустить возможность получения ложноположительных данных (неспецифичное реагирование) при использовании технологии иммуноферментного анализа (ИФА).

Заключение. Для повышения качества результатов лабораторного исследования АФП необходимо придерживаться комплексного подхода к выбору метода исследования с учетом аналитических характеристик, реагентов производителей, ограничений в использовании метода, интерференции, а также когорты пациентов, подлежащих данному тестированию. В случае отсутствия возможности исключения ИФА как самого распространенного «бюджетного» метода из лабораторной практики определения АФП и (по всей вероятности) других онкомаркеров считаем целесообразным и даже необходимым использование иммунохемилюминесцентного метода исследования – как подтверждающего.

Ключевые слова: альфа-фетопротеин, хронический гепатит, цирроз печени, иммунохимический анализ, иммуноферментный анализ

Rogacheva T.¹, Gribok I.², Bayur N.¹, Anisko L.^{1,2}✉

¹ City Clinical Hospital of Infectious Diseases, Minsk, Belarus

² Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Features of Implementing Alpha-Fetoprotein Immunochemical Assay Techniques for Achieving Diagnostically Significant Results of Its Quantification

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: concept, material collecting and research design, text writing – Rogacheva T.; material collecting, statistical data processing, text writing – Gribok I.; material collecting and research design – Bayur N.; concept, editing – Anisko L.

Submitted: 06.09.2023

Accepted: 12.02.2024

Contacts: luidok@mail.ru

Abstract

Introduction. Alpha-fetoprotein (AFP) is a glycoprotein that was first identified in human fetal serum in 1956, and described as an oncofetal antigen in 1964. Quantification of AFP level has found wide application in oncology and prenatal diagnostics. Determination of AFP concentration in dynamics in oncopathology has prognostic value for evaluating the effectiveness of therapy, the risk of recurrence of the tumor process, and patient survival. It was noted that the increase in the level of this cancer marker in benign liver diseases was mostly temporary; therefore, a number of researchers did not recommend using this test as a screening test in oncology screening. However, current Western and Asian guidelines do not recommend using AFP assay for diagnosing hepatocellular carcinoma (HCC) because of its low diagnostic sensitivity and specificity, and its optimal diagnostic threshold for HCC remains controversial. The method for determining AFP concentration is immunochemical assay in its various modifications: enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), chemiluminescent immunoassay, enzyme-linked fluorescent assay and others.

Purpose. To determine the most appropriate modification of the immunochemical assay technique for AFP quantification and to evaluate the significance of this laboratory test in HCC screening in patients with chronic viral hepatitis.

Materials and methods. The study included 3048 patients with chronic viral hepatitis, who were under outpatient observation at the consultative and diagnostic office for viral hepatitis of the Minsk City Clinical Infectious Diseases Hospital. The following modifications of immunochemical assay were used for AFP quantification: enzyme immunoassay and chemiluminescent immunoassay.

Results. Among the examined group of patients, a positive result (AFP level above 15 IU/mL) was obtained in 15.2% of samples by ELISA method. Repeated blood samples taken from patients with high AFP levels (more than 200–400 IU/mL and higher) were tested using another immunochemical assay modification (Chemiluminescent immunoassay), and the results obtained did not comply with ELISA results, i.e. they were not confirmed, and AFP levels obtained by chemiluminescent immunoassay were in most cases within reference values. When conducting simultaneous testing of patients' blood sera by two different immunochemical assay modifications, the coincidence of positive AFP results was observed only in 9.3% of cases, i.e. more than 90% of elevated AFP levels obtained



using ELISA were not confirmed in chemiluminescent immunoassay (CLIA). The results of the study allow assuming a possibility of false-positive results (non-specific response) when using ELISA technique.

Conclusion. To improve the quality of AFP laboratory test results, a comprehensive approach to test method selection should be implemented, taking into account analytical characteristics, manufacturers' reagents, limitations in method use, interferences, as well as patients' cohort to be tested. In case when there is no possibility to exclude ELISA as the most common low-cost method from the laboratory practice of AFP and (apparently) other cancer markers assays, we consider as appropriate and even indispensable the use of chemiluminescent immunoassay as a confirmatory one.

Keywords: alpha-fetoprotein, chronic hepatitis, liver cirrhosis, immunochemical assay, enzyme immunoassay

■ ВВЕДЕНИЕ

Альфа-фетопротеин (АФП) – гликопротеин, который впервые был идентифицирован в сыворотке крови плода человека в 1956 г. и описан как онкофетальный антиген (АГ) в 1964 г. По своему аминокислотному составу и физико-химическим свойствам АФП близок альбумину человека, синтезируется в основном желточном мешке плода, поступая в амниотическую жидкость и кровь, трансплацентарно проникает в кровь беременной женщины, а также в печень человека.

Количественная оценка АФП нашла широкое применение в онкологии и пренатальной диагностике. Определение содержания АФП в сыворотке крови беременной женщины или в амниотической жидкости плода является скрининговым показателем для мониторинга развития плода, выявления наличия различной его патологии (дефекты нервной трубки, синдром Дауна и др.). Высокие уровни АФП являются маркером главным образом гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК), а также рака яичек, яичников, пищевода. Следует отметить, что рост содержания АФП отмечается также при гепатитах (острых, хронических), циррозе печени, онкологических поражениях желудочно-кишечного тракта и некоторой другой патологии (врожденный тирозиноз, атаксия-телеангиэктазия). Определение концентрации АФП в динамике при онкологической патологии имеет прогностическое значение для оценки эффективности проводимой терапии, риска рецидива опухолевого процесса, выживаемости пациентов. Отмечено, что повышение уровня данного онкомаркера при заболеваниях печени доброкачественного характера чаще носит временный характер, в связи с чем ряд исследователей не рекомендуют использовать определение АФП в качестве скринингового теста при онкопоиске [1].

Основными показаниями для назначения определения количества АФП являются диагностика патологии, а также определение в динамике для оценки эффективности проводимой терапии, выявления возможного рецидива, прогноза течения и исхода патологического процесса.

Однако авторами ряда руководств, изданных в странах Запада и Азии, не рекомендуется использовать АФП для диагностики ГЦК из-за его низкой чувствительности и специфичности, а его оптимальный диагностический порог для ГЦК к настоящему времени все еще остается спорным. Кроме того, уровни АФП могут повышаться

из-за других злокачественных новообразований (желудочных, гонадных) и доброкачественных причин, таких как беременность и хронические заболевания печени, связанные с вирусом гепатита В (HBV) и вирусом гепатита С (HCV) [2–6].

Для определения концентрации АФП используется иммунохимический анализ в различных его модификациях: иммуноферментный, хемилюминесцентный, фермент-связанный флуоресцентный и другие.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить наиболее удовлетворяющую получению диагностически значимых результатов модификацию иммунохимического метода количественного определения АФП и оценить значимость данного лабораторного теста в скрининге гепатоцеллюлярной карциномы у пациентов с хроническим вирусным гепатитом.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 3048 пациентов с хроническим вирусным гепатитом, состоявших на амбулаторном учете консультативно-диагностического кабинета по вирусным гепатитам УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска.

Для количественной оценки АФП использовался иммуноферментный и иммунохемилюминесцентный анализ. Принцип иммунологических методов заключается в выявлении комплекса антиген + специфические к нему антитела (АГ + АТ). Известный маркер (АГ или АТ) входит в состав диагностического набора (сорбирован на твердую фазу: дно полистироловой микропланшеты, поверхность наконечника, шариков, другой носитель), неизвестный – выявляется в исследуемом биологическом материале, главным образом в сыворотке крови.

При наличии в составе реагентов конъюгата-посредника (антивидовых иммуноглобулинов, меченных ферментом) метод называется непрямой. Способ обнаружения данного комплекса отражен в названии метода: с помощью фермента или другого химического реагента либо величины флуоресцентного или хемилюминесцентного сигнала.

Для расчета результатов оценки содержания АФП в состав набора реагентов входят калибраторы с заведомо известной его концентрацией.

Референтные уровни АФП (концентрация в крови здоровых людей) у различных производителей тест-систем указываются от 0 до 10 или 15 МЕ/мл (коэффициенты пересчета в мкг/л могут быть разные, например, 1,25 или 0,83).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клинико-диагностической лабораторией УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» в течение 2022 г. выполнено 2967 исследований по определению АФП методом иммуноферментного анализа, в результате чего были получены следующие данные (табл. 1).

Всего положительный результат (содержание АФП выше 15 МЕ/мл) был получен в 451 сыворотке крови, что составило 15,2%.

Следует отметить, что доля положительных проб, в которых уровни АФП превысили референтные значения, возросла с середины 2022 г. при неизменном методе определения (иммуноферментном) и производителе используемых реагентов.



Таблица 1
Уровни АФП пациентов с ХВГ, определенные методом ИФА
Table 1

AFP levels of patients with CVH determined by ELISA

Значение АФП	Кол-во пациентов	%
Менее 15 МЕ/мл	2516	84,8
16–20 МЕ/мл	41	1,4
21–50 МЕ/мл	218	8,7
51–100 МЕ/мл	79	3,1
101–300 МЕ/мл	56	2,2
301–400 МЕ/мл	13	0,5
401–800 МЕ/мл	39	1,6
801–1000 МЕ/мл	2	0,07
Более 1000 МЕ/мл	3	0,1

Причем все позитивные пробы тестировались двукратно. Кроме того, повторно взятые образцы крови у пациентов с высоким содержанием АФП (более 200–400 МЕ/мл и выше) исследовались в другой модификации технологии иммунохимического анализа (иммунохемилюминесценция), и полученные результаты не совпадали с результатами ИФА, то есть не подтверждались, а уровни АФП, полученные в результате использования иммунохемилюминесценции, в большинстве случаев входили в референтные значения.

В течение первых двух месяцев 2023 г. были проведены исследования положительных проб крови в ИФА от 118 пациентов с хроническим вирусным гепатитом с использованием иммунохемилюминесцентного метода, полученные результаты приведены в табл. 2.

Как видно из данных, представленных в табл. 2, совпадение положительного результата исследования АФП, выполненного различными методами, наблюдалось лишь в 11 случаях (9,3%), то есть более 90% повышенных уровней АФП не подтверждались. Данный факт позволяет предположить получение ложноположительных результатов (неспецифичное реагирование) в ИФА.

Попытка выяснения факторов, которые бы объясняли причины ложнопозитивных уровней АФП, определенных методом ИФА, четких результатов не дала. Анализ

Таблица 2
Уровень АФП у пациентов с ХВГ, определенный методами ИФА и ИХЛ за период январь – февраль 2023 г.
Table 2

AFP levels of patients with CVH determined by ELISA and CLIA methods in January – February 2023

	ИФА	ИХЛ
15,5–20 МЕ/мл	17	
21–50 МЕ/мл	43	1
51–100 МЕ/л	18	2
110–200 МЕ/мл	17	4
201–400 МЕ/мл	10	
Выше 400 МЕ/мл	13	4

клинико-диагностических, терапевтических данных по обследованным пациентам с повышенным количеством АФП – более 100 МЕ/мл – не выявил определенных зависимостей. Обследовались пациенты, состоящие на учете и получающие лечение на амбулаторном этапе, с диагнозами: хронический вирусный гепатит С (ХВГС) (их было абсолютное большинство – 30 человек: из них коинфекция с ВИЧ наблюдалась у 4 пациентов, двое имели сочетанную патологию – хронический вирусный гепатит С и хронический вирусный гепатит В (ХВГС + ХВГВ)), моноинфекция ВГВ наблюдалась у 4 лиц, ВГВ + ВГД были у 2 пациентов; с ВИЧ-инфекцией (без вирусных гепатитов) в данной группе обследуемых было трое. Следует отметить, что у 11 пациентов с ХВГС наблюдался цирроз печени.

Лечение вирусного гепатита С проводилось софосбувиром и даклатасвиром (у большинства пациентов РНК не выявлялась), ВГВ – в основном тенофовиром.

Активность ферментов (АЛС, АСТ, ГГТП) приблизительно у 30% обследованных наблюдалась в пределах нормальных значений, при повышенных уровнях возрастала умеренно, только в отдельных случаях активность ферментов была выраженной, как по АЛТ и АСТ, так и по ГГТП.

Показатели общего анализа крови пациентов, проходящих наблюдение и лечение на амбулаторном этапе, чаще имели нормальные значения. Из патологических показателей чаще была ускорена скорость оседания эритроцитов (до 30–40 мм/час), количество лейкоцитов определялось как повышенное, так и сниженное (в некоторых случаях наблюдались умеренный лейкоцитоз или лейкопения), у некоторых – моноцитоз. Следует отметить, что почти у каждого третьего пациента выявлялась тромбоцитопения.

Таким образом, следует полагать, что при количественном определении АФП методом ИФА получаемые повышенные значения целесообразно перепроверять другой модификацией иммунохимического анализа. За время использования нескольких модификаций иммунохимического анализа в лабораторной практике УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» иммунохемилюминесцентный метод определения АФП зарекомендовал себя как более специфичный по сравнению с методом ИФА.

Для грамотной интерпретации результатов лабораторных исследований важно учитывать аналитические и диагностические характеристики конкретного метода (диагностическая чувствительность, диагностическая специфичность, линейность, ограничения, интерференция), качество продукции производителей реагентов.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени количественная оценка АФП как биологического маркера карциномы печени по-прежнему играет важную роль в лечении пациентов с ГЦК и будет использоваться в лабораторной практике до тех пор, пока не завершится поиск идеального биомаркера при ГЦК, даже с учетом отсутствия четкой количественной интерпретации результатов (незначительное, умеренное повышение). Однако для повышения качества результатов лабораторного исследования АФП необходимо проявлять комплексный подход к выбору метода исследования с учетом его аналитических характеристик, реагентов производителей, ограничений метода, его интерференции, а также когорты пациентов, подлежащих данному тестированию. В случае отсутствия возможности исключения ИФА как наиболее широко распространенного



«бюджетного» метода из лабораторной практики для определения онкомаркеров, включая АФП, считаем целесообразным и необходимым использование иммунохемилюминесцентного метода исследования – как подтверждающего.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ball D., Rose E., Alpert E. Alpha-fetoprotein levels in normal adults. *Am J Med Sci.* 199;303:157–159.
2. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68:394–424.
3. Heimbach J.K., Kulik L.M., Finn R.S. AASLD guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2018;67:358–380.
4. European Association for the Study of the Liver EASL clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma [published correction appears in *J Hepatol.* 2019 Apr;70(4):817]. *J Hepatol.* 2018;69:182–236.
5. Omata M., Cheng A.-L., Kokudo N. Asia-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatocellular carcinoma: a 2017 update. *Hepatol Int.* 2017;11:317–370.
6. Kumar A., Acharya S.K., Singh S.P. 2019 update of Indian National Association for Study of the Liver consensus on prevention, diagnosis, and management of hepatocellular carcinoma in India: the Puri II recommendations. *J Clin Exp Hepatol.* 2020;10:43–80.