

ШАРИПОВА И.Н., ХОДАК Н.М., ПУЗЫРЕВ В.Ф., БУРКОВ А.Н., УЛАНОВА Т.И.

ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы», Нижний Новгород

## **СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ НА КАТЕГОРИИ ОБРАЗЦОВ СЫВОРОТОК КРОВИ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН**

*Выявление ложноположительных серологических реакций (ЛПР) на ВИЧ при скрининговом обследовании беременных женщин является актуальной проблемой практического здравоохранения. Собственные наблюдения авторов свидетельствуют о том, что при исследовании одних и тех же образцов сывороток крови беременных при помощи скрининговых иммуноферментных (ИФА) тест-систем разных производителей могут быть получены несовпадающие данные по ЛПР. Цель данной работы состояла в проведении сравнительной оценки специфичности ИФА тест-систем трех разных производителей: «ДС-ИФА-ВИЧ-АГАТ-СКРИН» (ООО «НПО «Диагностические системы»), «Genscreen Ultra HIV Ag-Ab» («Bio Rad», Франция) и «КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск). Исследовали 440 образцов сывороток крови беременных женщин, полученных из различных лечебно-профилактических учреждений города Нижний Новгород. Результаты проведенного исследования показали, что ЛПР были обнаружены во всех тест-системах, при этом спектр образцов различался. Установлена идентичная специфичность сравниваемых тест-систем - 98,64%. Предложен альтернативный стандартному подход к решению проблемы ЛПР на ВИЧ при скрининговых исследованиях у беременных: последовательное использование двух тест-систем четвертого поколения с различным форматом постановки реакции.*

**Ключевые слова:** ВИЧ-инфекция, специфичность, образцы сывороток крови беременных женщин

Sharipova I.N., Khodak N.M., Puzyrev V.F., Burkov A.N., Ulanova T.I.

## **THE COMPARATIVE STUDY OF SPECIFICITY OF TEST-SYSTEMS IN DIAGNOSTIC OF HIV-INFECTION ON CATEGORIES OF BLOOD SERUM OF PREGNANT WOMEN**

R&D Production Complex "Diagnostic Systems", Nizhniy Novgorod, Russia

*The detection of false positive serologic reactions (FPSR) on HIV-infection under screening examination of pregnant women is an actual problem of practical health care. The original observations testify that under analysis of the same samples of blood serum of pregnant women using screening immune enzyme test-systems of different manufacturers the unmatched data concerning FPSR can be obtained. The purpose of this study was to implement comparative evaluation of specificity of immune enzyme test-systems of three different manufacturers: "DS-EIA-HIV-AGAB-SCREEN" (RPC Diagnostic Systems, Nizhny Novgorod), "Genscreen Ultra HIV Ag-Ab" (Bio Rad, France) and "CombiBest HIV-1, 2 AG/AB" (Vector-Best, Novosibirsk). The sampling of 440 samples of blood serums of pregnant women from various medical institutions of Nizhny Novgorod was analyzed. The results of the study demonstrated that FPSR were detected in all test-systems and at that spectrum of samples differed. The identical specificity of compared test-systems amounted to*

98.64%. The alternative approach to FPSR to HIV issue under screening examinations of pregnant women was proposed. The proposed mode consisted of application of two test-systems of fourth generation with different format of setup of reaction.

Key words: HIV- infection; specificity; sample; blood serum of pregnant women

В нормативных документах ВОЗ [1] и Евросоюза [2] указаны пределы минимально допустимого уровня специфичности для скрининговых тестов на основе иммуноферментного анализа (ИФА):  $\geq 98\%$  и  $99,5\%$ , соответственно. Использование ИФА тест-систем для одновременного выявления специфических антител (АТ) к ВИЧ-1 и ВИЧ-2, а также антигена р24 ВИЧ-1 является стандартным методом лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции. Достаточно хорошо известен перечень факторов, которые не связаны с ВИЧ-инфекцией, но могут способствовать возникновению ложноположительных реакций (ЛПР) при ИФА-диагностике [3]. Наиболее значимые причины ЛПР в ИФА–диагностике ВИЧ-инфекции приведены в табл. 1.

Таблица 1

**Перечень факторов, являющихся причинами ЛПР ИФА-тестов для диагностики ВИЧ-инфекции**

<b>1. Факторы, ассоциированные с другими инфекциями</b>	
Респираторные инфекции верхних дыхательных путей	Острые вирусные инфекции, в том числе ДНК-содержащими вирусами
Лепра	IgM к вирусу гепатита А
Туберкулез	IgM к ядерному антигену вируса гепатита В
Инфекция, вызванная <i>Mycobacterium avium</i>	Ку-лихорадка (с сопутствующим гепатитом)
Инфекция, вызванная вирусом простого герпеса 1 и 2 типов (ВПГ-1, ВПГ-2)	Инфекции, вызванные другими ретровирусами
Грипп	Инфекция, вызванная вирусом Эпштейна-Барр
Малярия	Висцеральный лейшманиоз
Недавно перенесенная вирусная инфекция	
<b>2. Факторы, связанные с иммунизацией</b>	
Вакцинация против гриппа	Пассивная иммунизация: введение иммуноглобулинов
Вакцинация против гепатита В	Использование препаратов иммуноглобулинов, изготовленных до 1985г.
Вакцинация против столбняка	
<b>3. Факторы, связанные с системными аутоиммунными заболеваниями и реакциями</b>	
Аутоиммунные заболевания: системная красная волчанка, системная склеродермия,	Высокий уровень циркулирующих иммунных комплексов

дерматополимиозит	
Ревматоидный артрит	
<b>4. Факторы, связанные с присутствием АТ в крови</b>	
Антикарбогидратные АТ	АТ к гладкой мышечной ткани
Нормальные (естественные) антитела	АТ к париетальным клеткам желудка
Гипергаммаглобулинемия	Нормальные рибонуклеопротеины человека
Антилимфоцитарные АТ	АТ HLA (к антигенам лейкоцитов класса I и II)
Антимитохондриальные АТ	АТ к антигенам Т-клеточных лейкоцитов
Антинуклеарные АТ	АТ с высокой способностью связываться с полистиролом (используется в тест-системах)
Антимикросомальные АТ	АТ к коллагену (определяются у мужчин, практикующих секс с мужчинами, у больных гемофилией и у больных лепрой)
<b>5. Факторы, связанные с потенциально кросс-реактивными реакциями</b>	
Беременность (особенно у неоднократно рожавших женщин)	ЛПР в других тестах, включая RPR-тест на сифилис
Гемолизированные образцы сыворотки крови	Кросс-реактивность неясного генеза у здоровых людей
Образцы сыворотки крови с гиперлипемией	Загрязнение фильтровальной бумаги веществами белковой природы
Образцы сыворотки крови, подвергшиеся тепловой обработке	Анальный секс
Ревматоидный фактор	
<b>6. Факторы, связанные с гемотрансфузией и трансплантацией органов</b>	
Гемотрансфузии, особенно множественные	Терапия препаратами альфа-интерферона пациентов, находящихся на гемодиализе
Трансплантация органов (в том числе почек)	Гемодиализ/почечная недостаточность
<b>7. Факторы, связанные с неинфекционными болезнями и новообразованиями</b>	
Первичный склерозирующий холангит	Гемофилия
Первичный билиарный цирроз	Злокачественные новообразования лимфоидной, кроветворной и родственных им тканей/лимфома
Алкогольный гепатит/алкогольное поражение печени	Злокачественные новообразования (рак)
Гипербилирубинемия	Миеломная болезнь
Синдром Стивенса-Джонсона	Рассеянный склероз

Однако это не означает, что все вышеперечисленные факторы непременно приводят к ЛПР. Многое зависит от конструктивных особенностей используемого теста, от времени воздействия инородных антигенов, в том числе возбудителей инфекционных заболеваний, на человека. Чем шире набор АТ в организме человека, тем выше вероятность наличия нескольких перекрестно реагирующих АТ. Особенно часто это

наблюдают у потребителей инъекционных наркотиков. Их организм просто перегружен антигенами.

Согласно приказу Минздрава РФ от 19.12.03 №606 [4] и приказу Мин здравсоц-развития РФ от 30.05.05 №375 [5], тестирование на ВИЧ включено в перечень рутинных лабораторных анализов, рекомендованных для обследования беременных женщин. Сыворотки крови беременных в лабораториях традиционно считают сложными, при их исследовании на ВИЧ высока вероятность получения ЛПР. Это связывают с тем, что во время гестации в крови женщин изменяются микроэлементный состав, концентрация цитокинов и гормонов, а кроме того, формируются специфические белки беременности [6-11]. Нередко ложноположительные результаты на ВИЧ при беременности отмечают у женщин с наличием в анамнезе инфекционных, аутоиммунных и хронических соматических заболеваний. Для того, чтобы выяснить, является ли проблема получения ЛПР проблемой только для какой-то конкретной тест-системы, или она присуща всем тестам на ВИЧ, проведено исследование образцов сывороток крови беременных с использованием трех тест-систем четвертого поколения для диагностики ВИЧ-инфекции.

Цель настоящей работы - сравнительная оценка специфичности ИФА-тест-систем для диагностики ВИЧ-инфекции при исследовании образцов сывороток крови беременных женщин.

*Материалы и методы.* Исследование образцов сывороток крови беременных женщин проводили с использованием ИФА-тест-систем разных производителей - «ДС-ИФА-ВИЧ-АГАТ-СКРИН» (ООО НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород), серия 108, срок годности до 11.12.14; «Genscreen Ultra HIV Ag-Ab» («Bio Rad», Франция), lot 1KO639, срок годности до 30.03.13 и «КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск), серия 1394, срок годности до 13.11.13. Для подтверждения положительных результатов, полученных в ходе скрининга, использовали иммуноблот (ИБ) «New Lav Blot I» производства «Bio Rad» (Франция), lot 2E0409b, срок годности до 30.05.13, и тест для детекции раннего маркера ВИЧ-инфекции антигена p24 ВИЧ-1 «ДС-ИФА-ВИЧ-АГ-СКРИН» (ООО НПО «Диагностические системы»), серия 098042, срок годности до 01.11.14.

Чувствительность теста при выявлении антигена p24 ВИЧ-1 составила 0,5 пг/мл (по стандарту HIV-1 ANTIGEN STANDARD, «Bio Rad» (Франция), кат. № 72217) или 0,025 МЕ/мл (по стандарту HIV-1 p24 ANTIGEN 1 International Reference Reagent, NIBSC, code: 90/636). Характеристика тест-систем представлена в таблице 2.

Исследование провели на 440 образцах сывороток крови беременных женщин, полученных из различных лечебно-профилактических учреждений Нижнего Новгорода.

*Результаты и обсуждение.* При первичном исследовании 440 образцов сывороток крови беременных во всех трех тест-системах были выявлены первично позитивные образцы: 15 образцов - в тест-системе «ДС-ИФА-ВИЧ-АГАТ-СКРИН», 16 образцов - в тест-системе «Genscreen Ultra HIV Ag-Ab» и 15 образцов - в тесте «КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ». Первично позитивные образцы были повторно протестированы в тест-системе той же серии и того же производителя. 21 повторно реактивный образец, согласно алгоритму лабораторной диагностики, исследовали в ИБ (табл. 3). Среди повторно реактивных образцов сывороток 7 образцов выявлены во всех трех тест-системах и в дальнейшем были подтверждены как ВИЧ-позитивные в ИБ, их доля составила 1,59% (7 из 440 образцов). При тестировании оставшихся повторно реактивных образцов получили несовпадающие результаты. 12 образцов с несовпадающими результатами показали отрицательный результат в ИБ и были расценены как ложнопозитивные (ЛП). 2 образца (№99 и №131) показали неопределенный результат в ИБ. Неопределенный

результат ИБ либо свидетельствует о начальной стадии ВИЧ-инфекции, либо указывает на то, что человек не инфицирован, но в его организме присутствуют АТ, неспецифически реагирующие с антигенами ВИЧ. Такой результат ИБ может быть получен у больных туберкулезом, онкологических больных, реципиентов, получающих многократные гемотрансфузии, у беременных женщин. Неопределенный результат в ИБ чаще всего обусловлен белками – продуцентами экспрессии гена gag ВИЧ-1 p15/p17, p24 и p55 [12]. 2 образца с неопределенным результатом в ИБ и отрицательным результатом в ИФА-тесте «ДС-ИФА-ВИЧ-АГАТ-СКРИН», но позитивным результатом в тестах «Genscreen Ultra HIV Ag-Ab» и «КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ» дополнительно исследовали на наличие антигена p24 ВИЧ-1. При исследовании этих образцов в высокочувствительном тесте «ДС-ИФА-ВИЧ-АГ-СКРИН» в обоих случаях получили отрицательный результат, что свидетельствовало об отсутствии раннего маркера ВИЧ-инфекции антигена p24 ВИЧ-1, и образцы расценили как ЛП. В результате проведенных исследований установили, что каждый тест выявляет в суммарном отношении одинаковое количество (6) ЛП образцов, однако спектр этих образцов отличается. Причинами такого результата в ИФА могут быть как реагенты различного происхождения, так и разные форматы тестирования.

Таблица 2

#### Характеристика ИФА тест-систем, используемых в исследовании

Наименование теста	Формат теста	Набор антител и антигенов	Чувствительность при выявлении антигена p24 ВИЧ-1	Время проведения анализа
ДС-ИФА-ВИЧ-АГАТ-СКРИН	Одноэтапный сэндвич ИФА	Моноклональные АТ к p24 ВИЧ-1, Rec-gp160, gp41 группы O, p31, gp 36	10 пг/мл (0,5 МЕ/мл)	термошейкер 1 ч 25 мин  термостат – 1 ч 50 мин
Genscreen Ultra HIV Ag-Ab	Двухэтапный сэндвич ИФА	Моноклональные АТ к p24 ВИЧ-1, Rec-gp160, peptide HIV1 группы O, peptide HIV-2	25 пг/мл	термостат - 2 ч
КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ	Двухэтапный сэндвич ИФА	Моноклональные АТ к p24 ВИЧ-1, rec-HIV1,2	10 пг/мл	термошейкер 1 ч 35 мин термостат- 2 часа
New Lav Blot I	Непрямой ИФА	ВИЧ-1 вирусные белки	-	3 часа 10 мин
ДС-ИФА-ВИЧ-АГ-СКРИН»	Одноэтапный сэндвич ИФА	Моноклональные АТ к p24 ВИЧ-1	0,5 пг/мл (0,025 МЕ/мл)	термошейкер 1 ч 55 мин

**Результаты исследования образцов сывороток крови беременных женщин**

Номер образца	ДС-ИФА-ВИЧ-АГАТ-СКРИН	КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ	Genscreen Ultra HIV Ag-Ab	NewLav Blot I	Результат блота
	Коэффициент позитивности (КП)				
16	<b>1,3</b>	0,8	0,92	-	отрицательный
44	<b>21,6</b>	<b>25,4</b>	<b>11,0</b>	Полный блот	положительный
52	<b>6,3</b>	0,4	0,27	-	отрицательный
80	0,12	<b>1,04</b>	0,34	-	отрицательный
97	<b>2,0</b>	0,45	0,3	-	отрицательный
98	<b>20,7</b>	<b>24,8</b>	<b>11,4</b>	Полный блот	положительный
99	0,05	0,22	<b>5,3</b>	p34/31	неопределенный
101	<b>9,4</b>	0,18	0,4	-	отрицательный
115	0,08	0,14	<b>1,02</b>	-	отрицательный
130	<b>19,6</b>	<b>24,8</b>	<b>11,4</b>	Полный блот	положительный
131	0,13	<b>2,8</b>	<b>3,8</b>	p55	неопределенный
136	0,1	<b>1,1</b>	<b>2,5</b>	-	отрицательный
139	0,1	<b>22,1</b>	0,3	-	отрицательный
181	<b>14,3</b>	<b>26,3</b>	<b>11,4</b>	Полный блот	положительный
233	<b>12,0</b>	<b>24,1</b>	<b>11,9</b>	Полный блот	положительный
244	<b>1,56</b>	0,29	0,32	-	отрицательный
320	<b>15,6</b>	<b>21,6</b>	<b>12,2</b>	Полный блот	положительный
370	<b>6,0</b>	0,32	0,28	-	отрицательный
385	0,12	<b>3,0</b>	<b>1,6</b>	-	отрицательный
412	<b>15,0</b>	<b>22,7</b>	<b>11,0</b>	Полный блот	положительный
416	0,13	<b>1,2</b>	<b>1,12</b>	-	отрицательный

Как видно из данных, приведенных в табл. 3, четыре ЛП образца сывороток (№ 131, 136, 385 и 416) продемонстрировали реактивность как в тест-системе «КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ», так и в тест-системе «Genscreen Ultra HIV Ag-Ab». Данный факт может быть объяснен одинаковым форматом постановки реакции в этих тест-системах. Полученный результат позволяет сделать вывод о том, что использование тест-систем с одинаковым форматом постановки реакции при первичных и повторных скрининговых исследованиях образцов сывороток крови беременных женщин может привести к гипердиагностике и необходимости применения подтверждающего теста. Однако следует отметить, что если использовать тест-системы, отличающиеся антигенной специфичностью и форматом постановки реакции при повторном тестировании

образцов сывороток крови с положительным результатом на ВИЧ, то исчезнет необходимость применения подтверждающего теста, что позволит существенно сократить время и снизить затраты на дальнейшее исследование.

*Выводы.* 1. При исследовании образцов сывороток крови беременных в тест-системах, выявляющих маркеры ВИЧ-инфекции, специфичность тестов разных производителей совпадает и составляет 98,64% (95% доверительный интервал: 97,06–99,37).

2. Результаты, полученные при исследовании трех тестов на ВИЧ, показали, что ЛПР присущи всем тест-системам, при этом спектр ЛПР-образцов может отличаться. Следует отметить, что не существует ИФА со 100% специфичностью.

3. Предложен альтернативный подход к решению проблемы ЛПР на ВИЧ при скрининговом исследовании образцов сывороток крови беременных женщин - последовательное использование двух тест-систем четвертого поколения с различным форматом постановки реакции.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. World Health Organization. HIV assays operational characteristics: HIV rapid diagnostic tests (detection of HIV-1/2 antibodies): report 17; 2013
2. Commission decision of 3 February 2009 amending Decision 2002/364/EC on common technical specifications for in vitro-diagnostic medical devices. *Off J of the European Union*. 2009; 39:34-49.
3. Johnson C. Whose antibodies are they anyway? *Continuum*. 1996; Sept./Oct.
4. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 19.12.2003 №606 «Об утверждении инструкции по профилактике и передачи ВИЧ-инфекции от матери ребенку и образца информированного согласия на проведение химиопрофилактики ВИЧ».
5. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 30.05.2005 №375 «Об утверждении стандарта профилактики передачи ВИЧ-инфекции от матери ребенку».
6. Никулина Д.М. *Минорный белок сыворотки крови - связанный с беременностью альфа2-гликопротеин: теоретические и практические аспекты*: Дис. Москва; 2008.
7. Спиридонова Н.В., Балтер Р.Б. Прогнозирование развития гестоза с помощью многомерного математического анализа. *Вестник СамГУ - Естественнонаучная серия*, 2007; 2 (52): 264-76.
8. Чистякова Г.Н., Газиева И.А., Ремизова И.И., Черданцева Г.А., Черешнев В.А. Оценка цитокинового профиля при физиологической и нормально протекающей беременности. *Цитокины и воспаление*. 2007; 6 (1): 3-8.
9. Chao T.T., Sheffield J.S., Wendel G.D. Jr., Ansari M.Q., McIntire D.D., Roberts S. W. Risk factors associated with false positive HIV test results in a low-risk urban obstetric population. *J Pregnancy*. 2012; 2012:841979.
10. Doran T. I., Parra E. False-positive and indeterminate human immunodeficiency virus test results in pregnant women. *Arch. Fam. Med.* 2000; 9(9):924-29.
11. Wesolowski L. G., Delaney K. P., Lampe M.A., Nesheim S.R. False-positive human immunodeficiency virus enzyme immunoassay results in pregnant women. *PLoS One*. 2011 Jan 27; 6(1):e16538.
12. Евстигнеев И.В. Лабораторные методы диагностики острой, ранней и текущей ВИЧ-инфекции. *Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология*, 2012; 4: 34-40.

## REFERENCES

1. World Health Organization. HIV assays operational characteristics: HIV rapid diagnostic tests (detection of HIV-1/2 antibodies): report 17; 2013
2. Commission decision of 3 February 2009 amending Decision 2002/364/EC on common technical specifications for in vitro-diagnostic medical devices. *Off J of the European Union*. 2009; 39: 34-49
3. Johnson C. Whose antibodies are they anyway? *Continuum*. 1996; Sept./Oct.
4. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 606 of 19.12.2003 "On approval of the instructions for prevention of HIV transmission from mother to child and of the template of the informed consent for chemoprophylaxis for HIV prevention". (in Russian)
5. Order of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation No. 375 of 30.05.2005 "On the approval of the standard for prevention of HIV transmission from mother to child". (in Russian)
6. Nikulina D. M. *Pregnancy associated alfa2-glycoprotein, minor protein of blood serum: theoretical and practical aspects*: Dis/ Moscow; 2008. (in Russian)
7. Spiridonova N. V., Balter R. B. Forecasting of gestosis development by multidimensional mathematical analysis. *Vestnik of SamGU – Estestvennonauchnaya seriya*, 2007; 2 (52): 256-9.
8. Chistyakova G.N., Gazyeva I.A., Remizova I.I., Cherdantceva G.A., Chereshev V.A. Evaluation of a cytokine profile at physiological and normal pregnancy. *Citokiny i vospalenie*. 2007; 6 (1): 3-8.
9. Chao T.T., Sheffield J.S., Wendel G.D. Jr., Ansari M.Q., McIntire D.D., Roberts S. W. Risk factors associated with false positive HIV test results in a low-risk urban obstetric population. *J Pregnancy*. 2012; 2012:841979.
10. Doran T. I., Parra E. False-positive and indeterminate human immunodeficiency virus test results in pregnant women. *Arch. Fam. Med.* 2000; 9(9):924-9.
11. Wesolowski L. G., Delaney K. P., Lampe M.A., Nesheim S.R. False-positive human immunodeficiency virus enzyme immunoassay results in pregnant women. *PLoS One*. 2011 Jan 27; 6(1):e16538
12. Yevstigneyev I.V. Laboratory methods of diagnostics of acute, early and current HIV infection. *Klinicheskaya immunologiya. Allergologiya. Infektologiya*. 2012; 4: 34-40. (in Russian)

Опубликовано: *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2015 - №3, С.30-41