

**Северо-Западное отделение РАМН
Российский НИИ гематологии и трансфузиологии
Центр крови Минздрава России
Российская военно-медицинская академия
Региональная ассоциация специалистов трансфузионной медицины**

Т Р А Н С Ф У З И О Л О Г И Я

Научно-практический журнал

№ 1 (том 4) / 2003

Санкт-Петербург

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕФЕРЕНС-ПАНЕЛИ СЫВОРОТОК (ОСО-42-28-327-00) В КОНТРОЛЕ КАЧЕСТВА СЕРОДИАГНОСТИКИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

*Б. И. Шевелев, А.Х. Асади Мобархан,
А. Я. Ольшанский, Е. Б. Жибурт, Ю.А. Чемакин,
А.И. Мазус, Б. Вейблен*

Московский городской центр профилактики и борьбы со СПИД;
Медицинский Центр «Авиценна»;
Центр крови Минздрава России, Москва; BBI Diagnostics Inc, США

Вопросам качества диагностики ВИЧ-инфекции придавалось большое значение с момента организации Московского городского центра профилактики и борьбы со СПИД (МГЦ СПИД), что нашло отражение в Приказе Департамента здравоохранения г. Москвы № 544 от 20.09.95 «О системе гарантий качества при лабораторном исследовании инфицированности вирусом иммунодефицита человека в г. Москве» [1].

В указанном документе перечислены следующие текущие мероприятия по контролю качества серодиагностики ВИЧ-инфекции:

1. Входной контроль качества тест-систем для скрининговых и верификационных исследований.

2. Формирование слабо положительных («серозонных») контрольных образцов (домашний контроль (ДК); in-house-control) для использования в текущих исследованиях в скрининговых и верификационных лабораториях.

3. Формирование и анализ решения контрольных заданий для скрининговых и верификационных диагностических лабораторий.

Реализация этих положений закреплена за лабораторией иммунологии МГЦ

СПИД, верифицирующей результаты скрининговых лабораторий и являющейся референс-лабораторией Комитета здравоохранения г. Москвы. В период 1996–2002 гг. осуществлялось успешное внедрение в практику лабораторий всех мероприятий, указанных в приказе № 544. Данные по реализации комплекса мероприятий по контролю качества диагностики ВИЧ-инфекции в г. Москве и оценке его эффективности были опубликованы [2–8]. Осуществление контроля качества диагностики ВИЧ-инфекции позволило существенно сократить долю ложноположительных и ложноотрицательных результатов в скрининговых исследованиях. За указанный период не было случаев переливания инфицированной крови по вине диагностических лабораторий.

В период 2000–2002 гг. произошел переход диагностических лабораторий, в первую очередь лабораторий, исследующих донорскую кровь, на тест-системы

4-го поколения, позволяющие выявлять в исследуемом материале и специфические антитела к антигенам ВИЧ, и группоспецифический антиген p24 (тест-системы «антиген-антитело»). Использование более чувствительных тест-систем повысило требования, предъявляемые к системе контроля качества диагностики ВИЧ-инфекции.

Важнейшим недостатком использовавшейся до 2001 г. системы контроля качества диагностики было отсутствие стандартных сертифицированных контрольных сывороточных материалов.

В 2000 г. Государственным институтом по контролю медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича была сертифицирована «Референс-панель сывороток крови человека содержащих и не содержащих антитела к ВИЧ 1 типа (субтипа А, В и С) и 2 типа», ОСО-42-28-327-00. В данном сообщении представлены подходы к использованию сывороток Панели в контроле качества диагнос-

тики ВИЧ-инфекции, сформулированные на основе годичного ее применения (апрель 2001 – апрель 2002 гг.).

ОСОБЕННОСТИ ПАНЕЛИ

Панель включает 24 индивидуальных человеческих сыворотки. Для панели использованы жидкие нелиофилизированные неинaktivированные сыворотки, содержащие стабилизатор.

Сыворотки №№ 1–4 – индивидуальные неразведенные сыворотки здоровых доноров.

Сыворотки №№ 5–21 – индивидуальные неразведенные сыворотки ВИЧ-инфицированных пациентов, расположенные в Панели таким образом, что воспроизводят сероконверсию.

Сыворотки №№ 22 и 23 разведены 1:5, сыворотка № 24 разведена 1:3 сывороткой крови здорового донора (табл. 1).

СРАВНЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИФА-ТЕСТ-СИСТЕМ

Сыворотки №№ 5–24 титровали с шагом 2 в пределах 1: 50 – 1: 25000. В качестве растворителя при этом использовали сыворотки №№ 1–4. Все разведения исследовали в серийно выпускающихся в нашей стране тест-системах, проходивших Входной контроль в лаборатории иммунологии МГЦ СПИД и определяли максимальное разведение (титр), позволяющее получить сигнал, превосходящий контрольный уровень (критерий, cut-off).

Было показано, что, используемые ныне для скрининговых исследований, тест-системы¹ можно подразделить на три группы (рис. 1). К первой группе (наиболее чувствительные тест-системы) относятся тест-системы «антиген-антитело». Вторую, наиболее крупную группу, образуют

¹ В примерах, приведенных в статье, результаты получены на конкретных тест-системах, однако после консультаций с производителями/дистрибьюторами названия диагностикумов сняты.

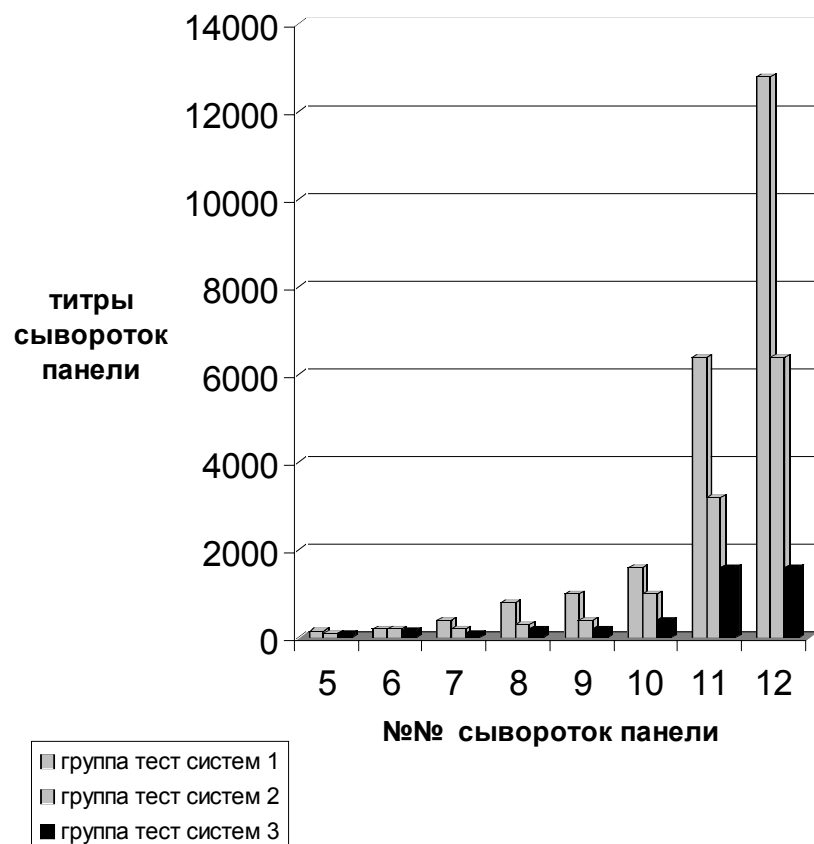
Таблица 1 – Специфичность антител к антигенам ВИЧ в сыворотках Референс-панели ОСО-42-28-327-00

№№ сыворотки	БЛОТ (Newlav BLOT, BIO-RAD, Франция – США).	ИФА (Abbot HIV 1/2, США), ОП/критерий
1	-	0,1
2	-	0,1
3	-	0,1
4	-	0,1
5	24	8
6	24, 55, 160	11,5
7	18, 24, 160	> 17,7
8	18, 24, 55, 160	5,5
9	18, 24, 55, 120, 160	16,1
10	18, 24, 55, 160	12,1
11	18, 24, 55, 120, 160	10,7
12	24, 160	14,4
13	24, 55, 120, 160	> 17,7
14	24, 41, 120, 160	16,2
15	18, 24, 55, 120, 160	9,8
16	18, 24, 65, 120, 160	15,5
17	18, 24, 51, 55, 65, 120, 160	13,7
18	18, 24, 31, 41, 51, 55, 65, 120, 160	> 17,7
19	18, 24, 31, 41, 51, 55, 65, 120, 160	> 17,7
20	18, 24, 31, 41, 51, 55, 65, 120, 160	> 17,7
21	18, 24, 31, 41, 51, 55, 65, 120, 160	> 17,7
22, субтип А	18, 24, 31, 41, 51, 55, 65, 120, 160	> 17,7
23, субтип С	18, 24, 31, 41, 51, 55, 65, 120, 160	> 17,7
24	18, 24, 31, 55, 65	> 17,7

тест-системы со средней чувствительностью, созданные в нашей стране. К третьей группе относятся тест-системы с низкой чувствительностью, использование которых в практике было временно приостановлено по результатам сравнительных испытаний тест-систем,

которые провел ГИСК им. Л.А.Тарасевича в 2001 г. [9]. Таким образом, характеристики тест-систем, полученные с помощью представляемой Панели, согласуются с данными, полученными при применении панелей ОСО 42-28-212-93.

Рисунок 1 – Сравнение чувствительности тест-систем



Наиболее интересные результаты получены при использовании в титровании сывороток №№ 5–15. Показано, что тест-системы отечественного производства могут сильно, более чем в 10 раз, различаться по способности выявлять специфические антитела в отдельных сыворотках этой группы, однако возможно сформиро-

вать пары тест-систем, которые гарантированно выявляют антитела во всех сыворотках Панели с высокой чувствительностью. Правило исследования сывороток в двух тест-системах различного производства, причем желательно чтобы в одной тест-системе были применены синтетические пептидные

антигены, а в другой – рекомбинантные, является основной схемой подтверждения результатов для всех положительных и «сомнительных» сывороток [1]. В таблице 2 продемонстрировано удачное сочетание пептидной и рекомбинантной тест-систем.

Таблица 2 – Титры сывороток Панели в двух тест-системах отечественного производства

№№ сывороток Панели	Титры* в тест-системе I	Титры в тест-системе II
5	150	200
6	64	200
7	400	300
8	350	300
9	300	350
10	350	400
11	400	400
12	450	450
13	500	350
14	550	450
15	1200	600

* Максимальное разведение сыворотки с сигналом выше cut-off.

ВХОДНОЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ТЕСТ-СИСТЕМ

Входному контролю подвергаются все партии тест-систем, затем используемые в скрининговых и вери-

фикационной лабораториях МГЦ СПИД [1]. В течение года в лабораторию поступает 2–8 серий каждой из основных тест-систем. При проведении Входного контроля использовали сыво-

ротки Панели №№ 1–21. По результатам исследования рассчитывали титры сывороток Панели для каждой серии каждой тест-системы. Таким образом, на базе сывороток Панели была сформирована панель Входного контроля, применимая для оценки всех используемых в настоящее время тест-систем. Описанная панель Входного контроля позволяет выявлять колебания титров сывороток от серии к серии.

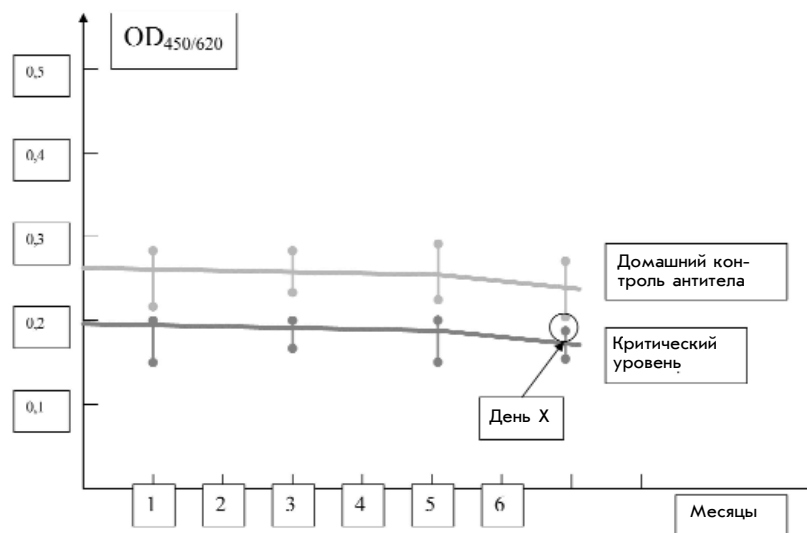
ФОРМИРОВАНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДК

ДК всегда формируется из сыворотки, содержащей антитела ко всем антигенам ВИЧ, и подстраивается титрованием в сыворотке донора под конкретную тест-систему, используемую на данный момент в лаборатории, таким образом, чтобы получить в ИФА сигнал, превышающий контрольный уровень (cut-off) на 0,1–0,15. Для формирования ДК использовали сыворотку №22 представляемой Панели. Показано, что аликвота ДК,

хранящаяся при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ в течение недели, позволяет получить стабильный сигнал в ИФА, а затем должна быть заменена следующей аликвотой, хранящейся при температуре не выше -20°C . ДК используют ежедневно (1 лунка в каждом планшете), что позволяет выявить технические ошибки при постановке реакции и оценить стабильность компонентов тест-системы в течение срока годности серии. На рисунке 2 показано, что в течение срока годности серии исследования осуществляли стабильно, однако в день X была совершена техническая ошибка, при обнаружении которой необходимо повторение исследования. Показано, что к концу срока годности серии оптические плотности контролей тест-системы снижаются, не выходя из пределов указанных в Инструкции по применению тест-системы. Это наблюдение подтверждается и снижением абсолютных величин ДК при стабильном соотношении $\text{ОП}_{\text{ДК}}/\text{ОП}_{\text{cut-off}}$. Эти наблюде-

ния указывают на необходимость скорейшего использования серии.

Рисунок 2 – Домашний контроль для условной тест-системы



ФОРМИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ВЫПОЛНЕНИЯ КОНТРОЛЬНЫХ ЗАДАНИЙ

Контрольные задания в первую очередь служат инструментом контроля качества работы серодиагностических лабораторий, т.е. контроля качества работы персонала, оборудования

лаборатории, правильности принимаемых по результатам исследования заключений. В соответствии с этими целями для лабораторий МГЦ СПИД контрольные задания формируются по циркулярной схеме. Например, первое задание позволяет оценить колебания значений

оптической плотности для негативных сывороток, второе - оценить выявляемость сывороток, содержащих низкие концентрации антител к отдельным антигенам ВИЧ. В настоящее время появилось контрольное задание, позволяющее оценить выявление сывороток, содержащих растворимый антиген p24 на фоне различного уровня антител к этому и другим антигенам ВИЧ. Представляемая панель позволяет формировать любые контрольные образцы для контроля качества выявления специфических антител в ИФА-серодиагностике ВИЧ-инфекции.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, с использованием представляемой Панели возможно полностью выполнить все мероприятия внутреннего контроля качества диагностики ВИЧ-инфекции. По нашим наблюдениям сыворотки Панели обладают высокой стабильностью при аликвотировании и повторном замораживании

до температур ниже -20°C или хранения при температуре бытового холодильника. Панель укомплектована сыворотками с высокими титрами антител, и одного комплекта Панели (каждая сыворотка в объеме 250 мкл) достаточно для выполнения контрольных мероприятий в 8 лабораториях с общим объемом исследований 2 миллиона образцов ежегодно.

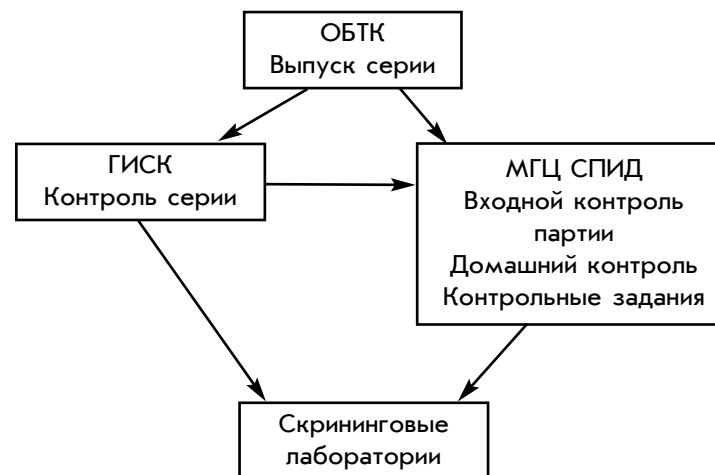
Вероятно, Панель будет более адаптирована для контроля качества серодиагностики ВИЧ-инфекции по правилам, используемым в МГЦ СПИД, и найдет более широкое применение, если будет укомплектована большим набором образцов индивидуальных негативных сывороток, контрольным образцом антигена p24 и большим объемом пула донорских сывороток для формирования рабочих образцов.

Перекрестный контроль качества тест-систем с использованием панелей ОСО-42-28-327-00 и ОСО 42-28-212-93 повысит качество тест-систем.

Весьма целесообразно применять Панель в ОБТК фирм-производителей диагностических тест-систем с указанием в Паспорте серии титров антител для каждой сыворотки Панели. С внедрением такой паспортизации тест-систем появляется возможность выстроить непрерывную систему контроля качества диагностики ВИЧ-инфекции (рис. 3). Использо-

вание Панели могло бы позволить полуколичественно оценивать уровни специфических антител в сыворотках пациентов с помощью ныне выпускаемых тест-систем, что позволило бы применять серологические исследования не только для первичной диагностики ВИЧ-инфекции, но и исследования сероконверсии.

Рисунок 3.



ЛИТЕРАТУРА

1. Список приказов Департамента здравоохранения по совершенствованию профилактики и лечению ВИЧ-инфекции в г. Москве. - Москва, 1996 - с. 62 - 90.
2. Shevelev B.I., Olshansky A.I., Preobrazenskya T.V. Results of systematic in-house-control use for verification tests by ELISA-diagnostics of HIV-infection// Russian journal of HIV/AIDS and related problems.- 1998.- Vol.2. №2.- p.109.
3. Данилова Т.И., Шевелев Б.И., Ольшанский А.Я. Опыт проведения внешней оценки качества лабораторного тестирования на наличие антител к ВИЧ// Русский журнал ВИЧ/СПИД и родственные проблемы. - 1999.- Т.3. №1.- с.106.
4. Шевелев Б.И., Ольшанский А.Я., Ефремов Е.Е., Асади Мобархан А.Х. Механизмы возникновения ложно-отрицательных результатов в серодиагностике ВИЧ-инфекции// Русский журнал ВИЧ/СПИД и родственные проблемы.- 1999.- Т.3. №1.- с. 114.
5. Шевелев Б.И., Ольшанский А.Я., Редченко Е.Б. и др. Теория и практика применения in-house-control в скрининговых и верификационных исследованиях по диагностике ВИЧ-инфекции// ЖМЭИ.- 1999.- № 1.- с. 60 - 61.
6. Shevelev B.I., Yakovets R.A., Olshansky A.Ya., Asadi Mobarhan A.H. The use of two-component in-house-control in enzyme immunoassay for HIV// Russian journal of HIV/AIDS and related problems.- 2000.- Vol.4. №1.- p.173.
7. Шевелев Б.И., Ольшанский А.Я., Гукасян И.А. и др. Применение антигенного домашнего контроля в тест-системах типа антиген-антитело в серодиагностике ВИЧ-инфекции// Русский журнал ВИЧ/СПИД и родственные проблемы.- 2002.- Т.6.- №1.- с.94.
8. Шевелев Б.И., Ольшанский А.Я., Асади Мобархан А.Х., Мазус А.И. Совершенствование системы мероприятий контроля качества диагностики ВИЧ-инфекции в условиях применения тест-систем антиген-антитело// Русский журнал ВИЧ/СПИД и родственные проблемы .- 2002.- Т.6.- №1.- с.95.
9. Отчет о сравнительных испытаниях диагностических иммуноферментных тест-систем для выявления антител к ВИЧ, разрешенных к применению в Российской Федерации.- М., 2001, с.4.