



*Точная диагностика -
эффективное лечение!*

Возможные причины ложноположительных результатов в ИФА

**Кузнецова Л.Л.,
Костюкова И.А., Хохлова Л.И.**

Абакан, 23 ноября 2016

Преимущества ИФА

- Высокие чувствительность (до 99,5%) и специфичность (99,994%);
- Простота выполнения анализа;
- Относительно недорогой;
- Небольшие объемы исследуемого материала;
- Стабильность компонентов наборов при хранении (до года и более);
- Возможность автоматизации всех этапов реакции.



Причины ложноположительных результатов в ИФА

- **Технические ошибки при проведении анализа:**

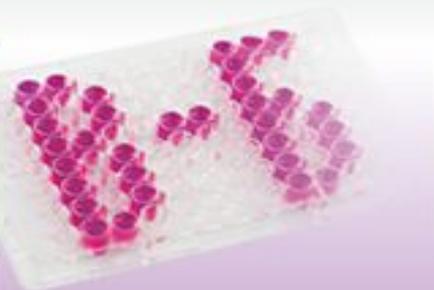
- Преаналитический этап - подготовка пациента к обследованию, взятие и обработка биологического материала;
- Аналитический (лабораторный) этап;
- Постаналитический этап – интерпретация и выдача результатов.

- **Биохимические (биологически опосредованные) причины:**

- Перекрестно реагирующие вещества в сыворотке крови.



Преаналитический этап



Преаналитический этап

- Неустранимые факторы (возраст, состояние пациента: беременность, аутоимунные заболевания, иммунодефицит, опухоли и т.д.);
- Варьирующие факторы (диета, прием лекарств, вакцинации);
- Время взятия крови (время приема пищи, лечебных и диагностических процедур);
- Техника взятия крови (качество и количество пробы, использование различных пробирок/контейнеров для забора крови);
- Ведение документации, идентификация человека и образца крови;
- Применение специальных добавок (антикоагулянты, ингибиторы гликолиза, консерванты, сепарирующие гели);
- Транспортировка и хранение проб;
- Центрифугирование;
- Браковка материала (гемолиз, хилез, фибриновые сгустки, липемия).

Ошибки на преаналитическом этапе

составляют 60% случаев и более! (Bonini, 2002)



Сравнительная характеристика гемоконсервантов

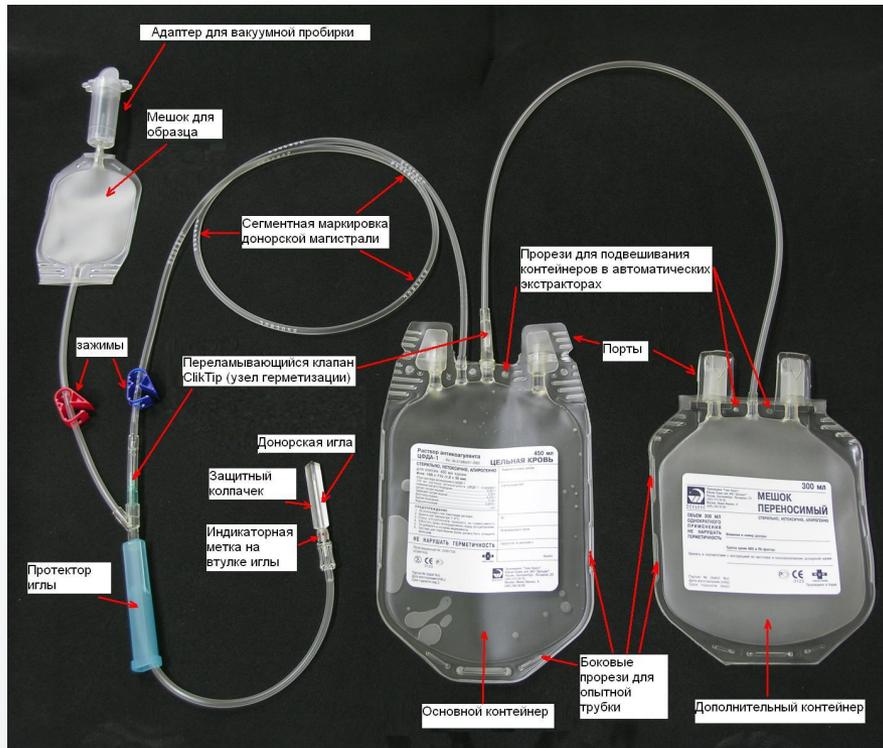
Наименование гемоконсерванта	Фаглюци д	CPDA	Глюгици р	Назначение компонента
Характеристика				
Срок хранения крови, дней	50	30	21	
Соотношение препарата и крови при консервировании	1:4	1:7	1:4	
Компоненты, г /100мл раствора				
Натрия цитрат	1,4	2,63	2,0	Предотвращает свертывание крови
Кислота лимонная	0,1365	0,299		Регулирует PH
Натрия фосфат	0,75	0,222		
Аденин	0,034	0,027		
Глюкоза	3,0	3,19	3,0	Питание

Влияние содержимого полимерных контейнеров на ОП анализируемого образца

Гемоконсервант	Фаглюцид	CPDA	Глюгид	Без консерванта
Соотношение препарата и крови	1:4	1:7	1:4	Цельная сыворотка
ОП	0,160	0,072	0,225	0,081
К позитивности (ОП обр/ОПкрит)	0,73	0,328	1,03	0,37



Работа с контейнерами для сбора и хранения крови



- Попадание гемоконсервантов в пробоотборник для анализов приводит к получению ложноположительных результатов!
- Недостаточный объем крови приводит к изменению соотношения гемоконсервантов и крови, что также может служить причиной ложноположительных результатов.



Цветовая маркировка вакуумных пробирок

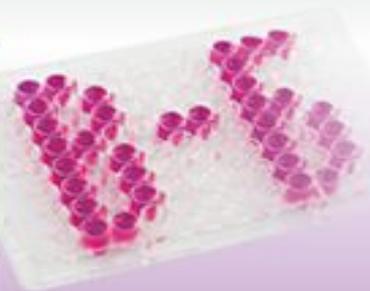
Цветовой код	Область применения	Химические наполнители
Стеклянные  красный	Исследования сыворотки в клинической химии, серологии, иммунологии	Без наполнителя
 голубой	Исследования коагуляции	Цитрат натрия STAD
 черный	Измерение скорости оседания эритроцитов (СОЭ)	Цитрат натрия
Пластиковые  красный	Исследования сыворотки в клинической химии, серологии, иммунологии.	Активатор свертывания
 желтый	Исследования сыворотки в клинической химии, серологии, иммунологии	Активатор свертывания и разделительный гель

Цветовой код	Область применения	Химические наполнители
 зеленый	Исследования плазмы в клинической химии, иммунологии	Гепарин; Гепарин и разделительный гель
 сиреневый	Гематологические исследования цельной крови	ЭДТА
 розовый	Пробирки для перекрестной пробы, используются при переливании крови	ЭДТА; Активатор свертывания; Без наполнителя
 серый	Исследования глюкозы	Фторид натрия/ Оксалат калия; Литий-йодоацетат/ литий-гепарин
 синий	Исследования микроэлементов	Без наполнителя; ЭДТА

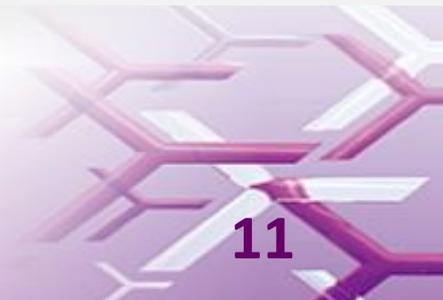
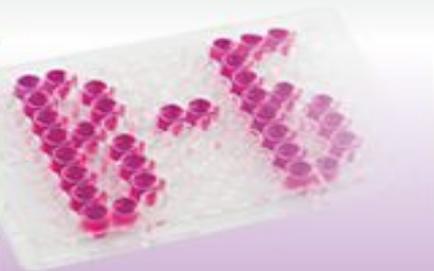


Важно: цветовая маркировка пробирок, произведенных в США и ЕС может различаться!

Европейская	Добавка	Американская
	Сыворотка (активатор свёртывания)	
	Сыворотка-Гель	
	Li-Гепарин	
	Глюкоза	
	К-ЭДТА	
	СОЭ (цитрат 1:4)	
	Коагулогия (цитрат 1:9)	



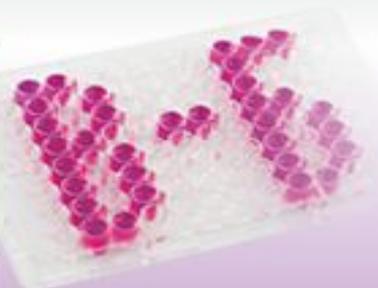
Аналитический (лабораторный) этап



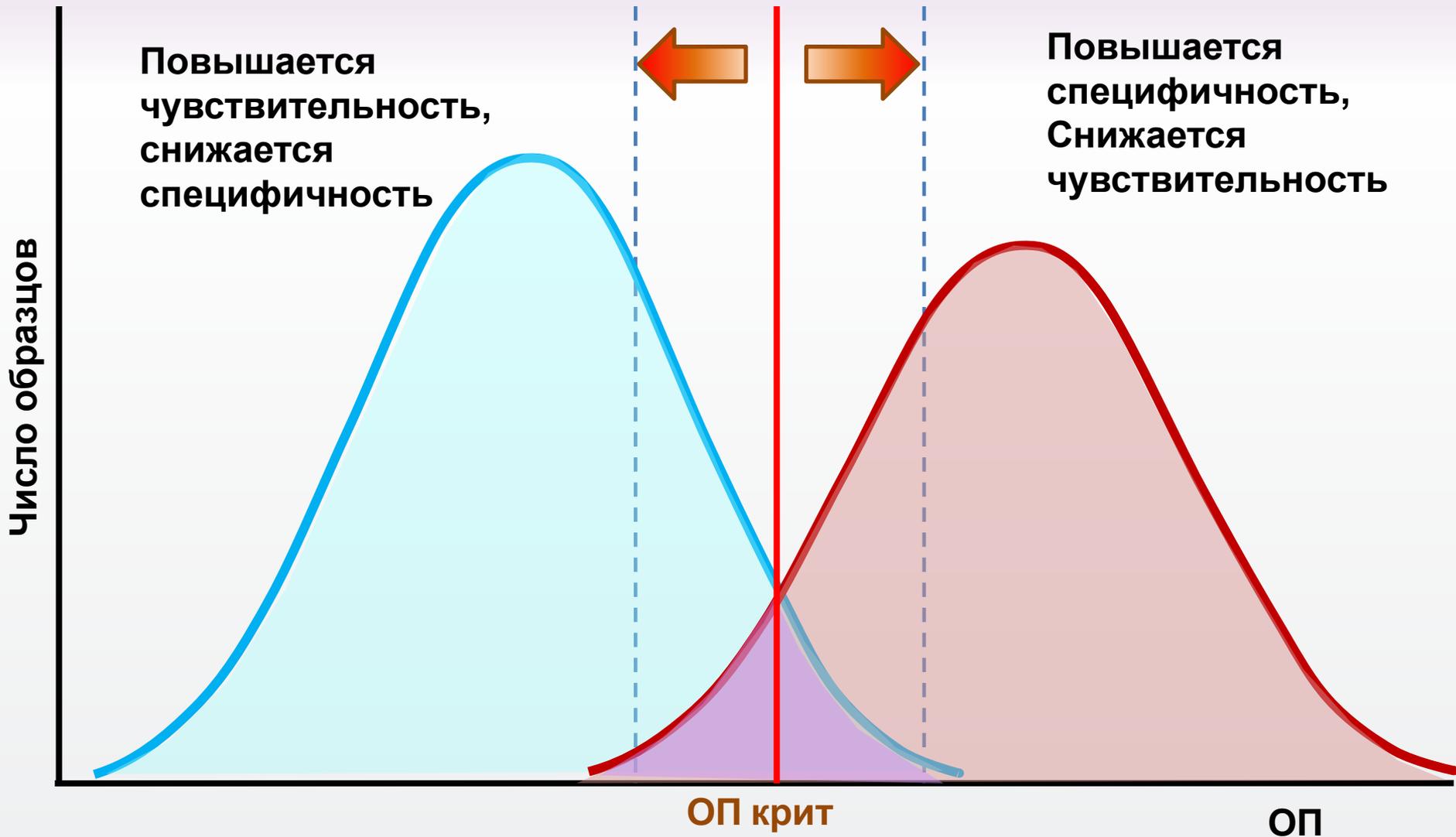
Точность скрининговых тестов на основе ИФА

Анализ работы 752 лабораторий США показал, что **чувствительность** тестов на основе ИФА составила **99.7%**, а **специфичность** - **98.5%**. При исследовании крови доноров, специфичность ИФА достигала значения выше **99.99%** .

В сочетании с методом Вестерн-блот, вероятность ложноположительного результата при исследовании донорских сывороток составляет 1 : 250 000 (Chou *et al.*, 2005).



Нормальное распределение ОП при анализе сывороток на антитела к ВИЧ



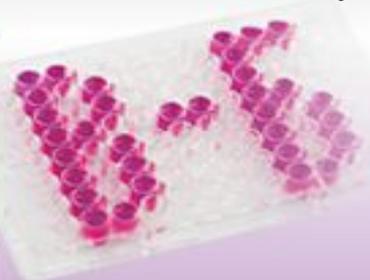
Скрининг vs. подтверждение

Набор 1

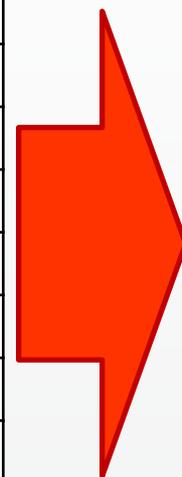
1

0,029	0,022	0,024	0,031	0,028	0,024	0,035	0,030	0,024	0,020	0,028	0,021
0,030	0,030	0,030	0,029	0,025	0,034	0,029	0,020	0,035	0,026	0,169	0,027
0,026	0,035	0,034	0,035	0,031	0,032	0,033	0,025	0,033	0,033	0,022	0,025
0,123	0,020	0,028	0,020	0,021	0,033	0,025	0,033	0,035	0,034	0,021	0,029
0,034	0,020	0,032	0,030	0,190	0,025	0,027	0,034	0,021	0,025	0,034	0,026
0,031	0,028	0,032	0,023	0,031	0,034	0,029	0,029	0,129	0,027	0,032	0,021
0,020	0,028	0,031	0,026	0,020	0,022	0,035	0,033	0,035	0,025	0,021	0,025
0,033	0,031	0,026	0,028	0,025	0,032	0,031	0,027	0,028	0,032	0,028	0,029

ОП крит. =
0,124

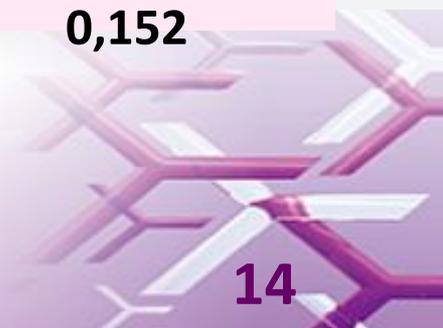


Набор 2



0,003
0,027
0,021
0,031

ОП крит. =
0,152



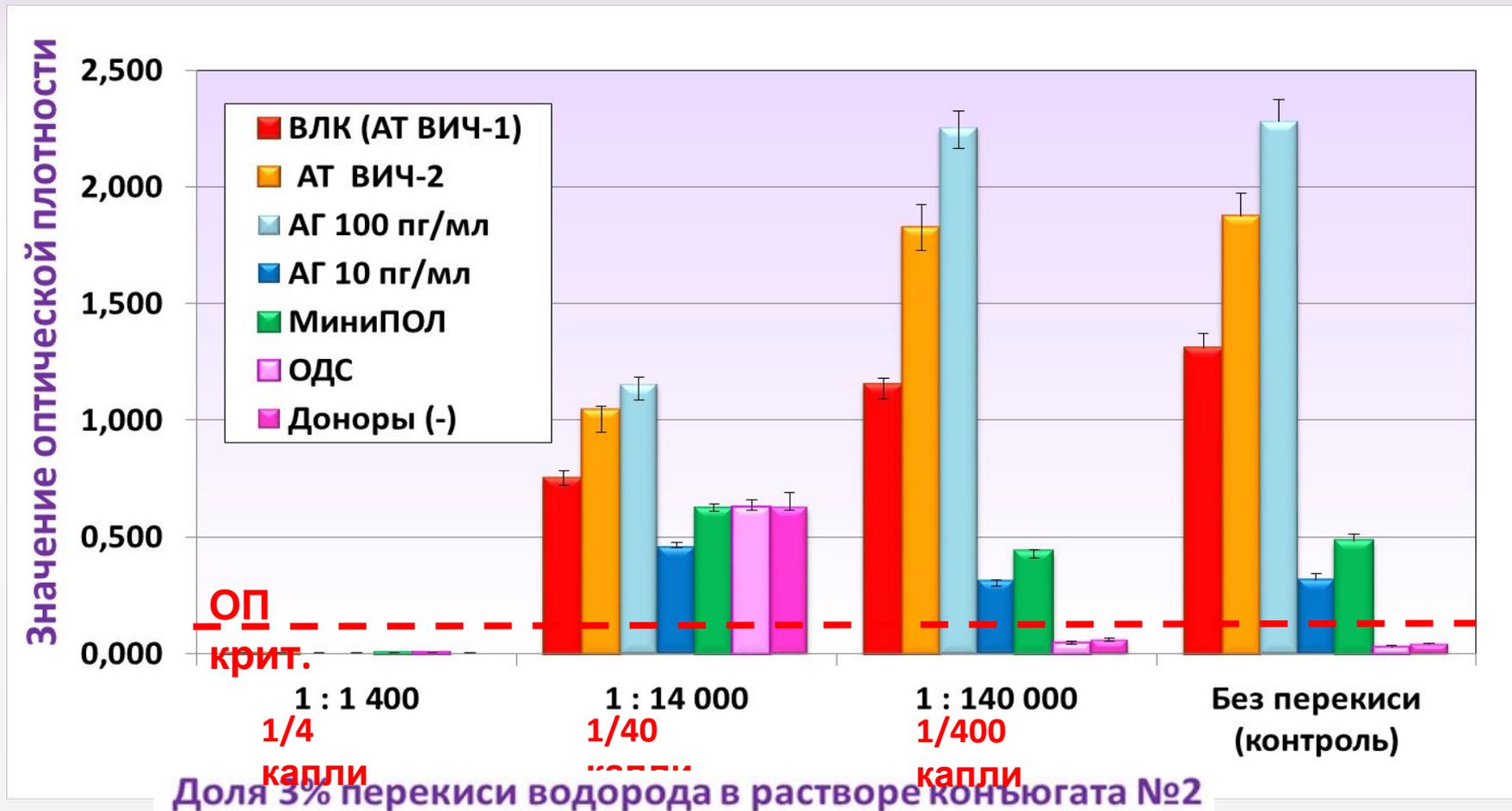
Биологические причины ложноположительных результатов в ИФА

1. «Антигенная мимикрия» (антигены шистосомоза);
2. Присутствие антител к другим ретровирусам;
3. Высокое содержание липидов в сыворотке;
4. Гемолизированные сыворотки;
5. Аутоантитела (антитела ревматоидного фактора, аутоантитела против коллагена);

6. Антитела против углеводов;
7. Аутоиммунные заболевания, сопряженные с активацией поликлональных лимфоцитов;
8. Острые вирусные инфекции;
9. Вакцины против ВИЧ и гриппа;
10. Злокачественные опухоли;

66 причин согласно Christine Johnson, 1996

Технические ошибки. Попадание перекиси в рабочий раствор конъюгата № 2



Объём одной капли $H_2O_2 \approx 40$ мкл.

40 мкл 3% H_2O_2 на 1 фл. раствора конъюгата (14 мл) = доля 3%-перекиси в растворе - 1:350.

14 000 : 350 = 40 . Достаточно 1/40 части капли 3% H_2O_2 , чтобы получить неправильные результаты!!

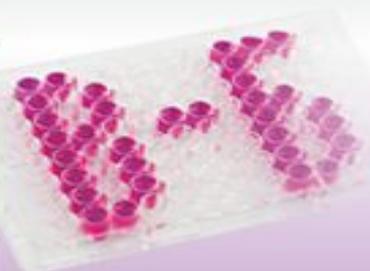
Технические ошибки. Плёнка для заклеивания планшетов

Образец	ВЛК (АТ ВИЧ-1)	АГ 100 пг/мл	АГ 10 пг/мл	Мини ПОЛ (АТ ВИЧ-1)	Доноры (-)	ОДС	ОП крит.
	Значение оптической плотности						
С плёнкой	1,209	2,100	0,291	0,441	0,064	0,036	0,130
Без плёнки	1,502	2,322	0,472	0,726	0,226	0,175	0,253

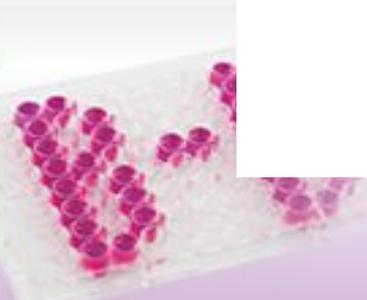
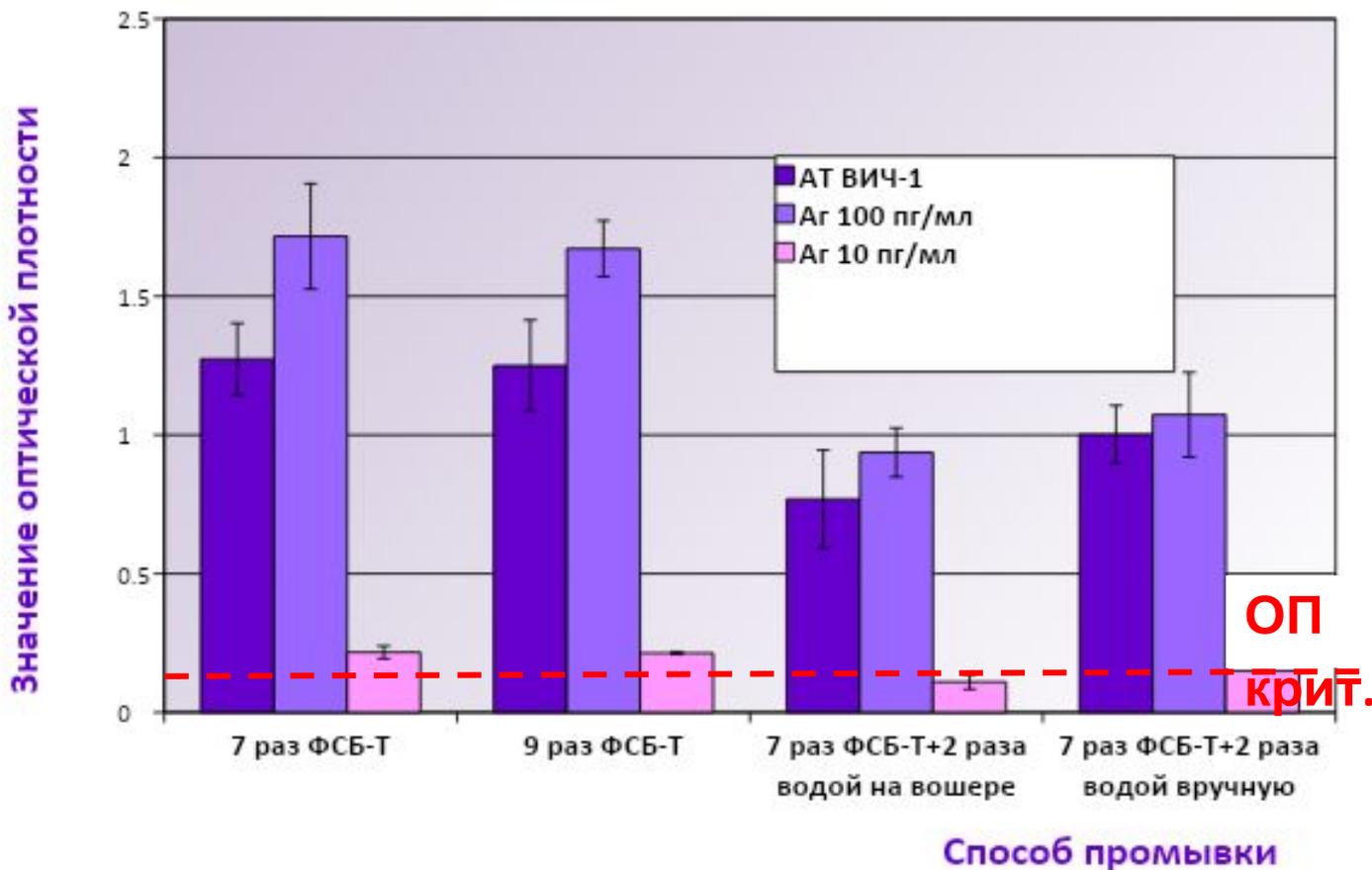


Технические ошибки. Нарушение условий промывки планшетов

Образец/ Раствор для промывки	ВЛК (АТ ВИЧ-1)	Аг 100 пг/мл	Аг 10 пг/мл	(-)	ОДС	МиниПО Л	ОП крит
	Значение оптической плотности						
Вода	1,683	1,666	0,402	0,673	0,576	1,109	0,817
ФСБ-Т 50Х	1,293	1,922	0,281	0,079	0,058	0,502	0,166
ФСБ-Т 25Х	1,353	1,991	0,232	0,059	0,030	0,450	0,122

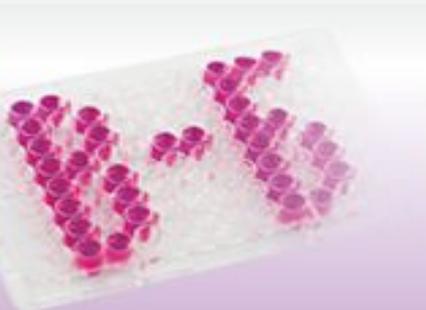


Технические ошибки. Нарушение условий промывки планшетов

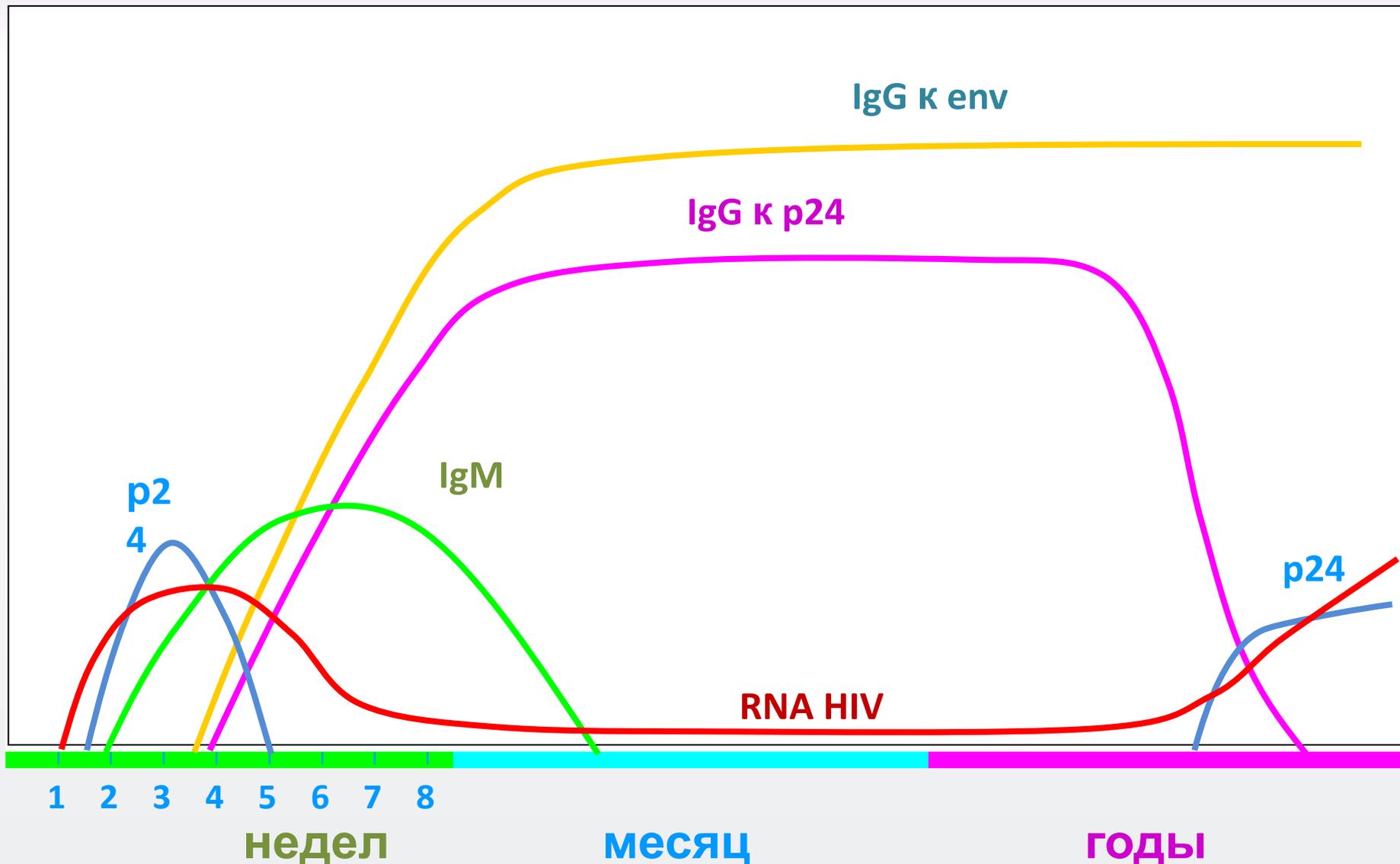


Причины ложноотрицательных результатов

- Серонегативное «окно» - 10-14 дней от момента инфицирования;
- Серореверсия (поздние стадии, ВААРТ);
- «Атипичная иммунная реакция»;
- Агаммаглобулинемия (врожденный гуморальный иммунодефицит);
- Инфекция штаммом редкой группы или ВИЧ-2;
- Технические ошибки.



Специфические маркеры ВИЧ в динамике развития инфекционного процесса



Примеры ложноотрицательных результатов ИФА

Исследование сыворотки в СПК

Метод	Выявляемый маркер	Чувствительность	Производитель	Результат
ПЦР	РНК ВИЧ	20 МЕ/мл	АО «Вектор-Бест»	+
ИФА, "EVOLIS"	Анти-ВИЧ-1,2, р24 ВИЧ-1	25 пг/мл	Производитель 1	-
ИФА, постановка вручную	Анти-ВИЧ-1,2, р24 ВИЧ-1	25 пг/мл	Производитель 1	-
ИФА	р24 ВИЧ-1	0,5 пг/мл	Производитель 2	-
ИФА	Анти-ВИЧ-1,2, р24 ВИЧ-1	10 пг/мл	Производитель 2	-

Исследование сыворотки в лаборатории ИФА СПИД АО «Вектор-Бест»

ПЦР	РНК ВИЧ	20 МЕ/мл	АО «Вектор-Бест»	+
ИФА	Анти-ВИЧ-1,2, р24 ВИЧ-1	10 пг/мл	АО «Вектор-Бест»	+
ИФА	р24 ВИЧ-1	5 пг/мл	АО «Вектор-Бест»	+
ИФА	р24 ВИЧ-1	0,5 пг/мл	Производитель 2	+
ИФА	Анти-ВИЧ-1,2, р24 ВИЧ-1	5 пг/мл	Производитель 2	-
ИФА	Анти-ВИЧ-1,2, р24 ВИЧ-1	10 пг/мл	Производитель 3	-
ИФА	Анти-ВИЧ-1,2, р24 ВИЧ-1	25 пг/мл	Производитель 4	-

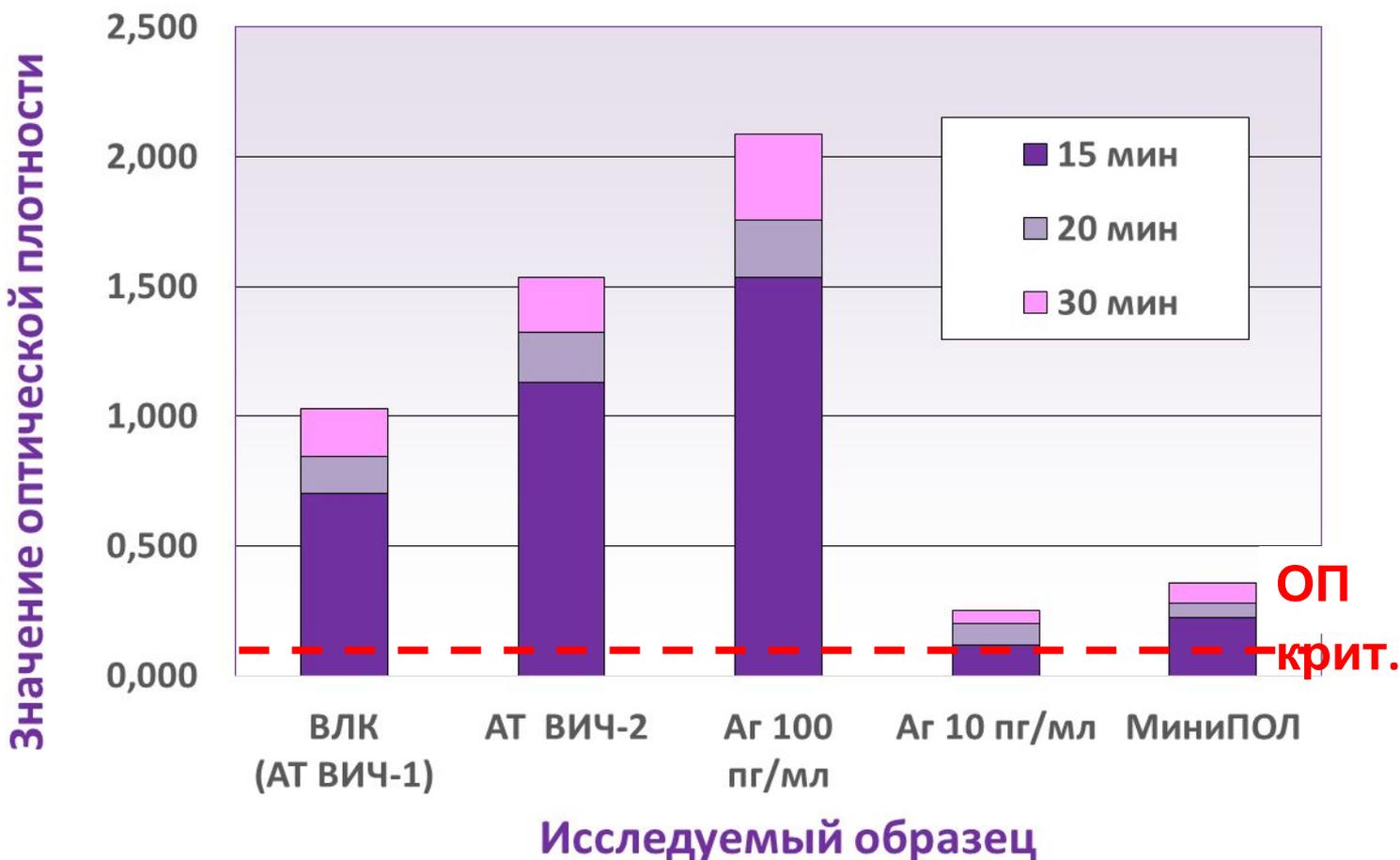
Примеры ложноотрицательных результатов

ИФА

СПК Приволжский ФО

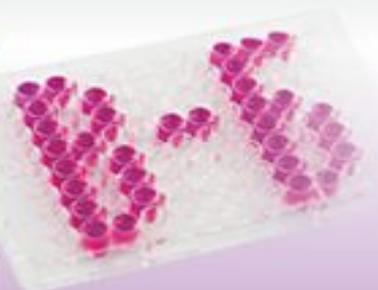
Тестирование	Дата сдачи крови		
	05.03.2013	12.03.2013	14.03.2013
ПЦР	Положительный Ct = 22	Положительный Ct = 22	Положительный Ct = 21
Architect HIV Ag/Ab Combo	Отрицательный S/Co = 0,32	Положительный S/Co = 2,09	Положительный S/Co = 3,03
«МилаЛаб-ИФА-ВИЧ-АГ+АТ»	Отрицательный К поз = 0,04	Отрицательный К поз = 0,04	Отрицательный К поз = 0,04
ДС-ИФА-ВИЧ-АГ-скрин	Отрицательный К поз = 0,18	Отрицательный К поз = 0,75	Отрицательный К поз = 0,44
КомбиБест-ВИЧ-1,2 АГ/АТ	Отрицательный К поз = 0,69	Положительный К поз = 3,54	Положительный К поз = 2,06
МБС ИФА ВИЧ 1,2 АГ/АТ	Не делали	Не делали	Отрицательный

Ложноотрицательные результаты. Сокращение продолжительности ферментативной стадии



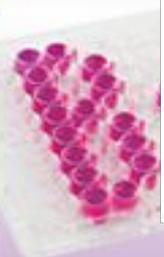
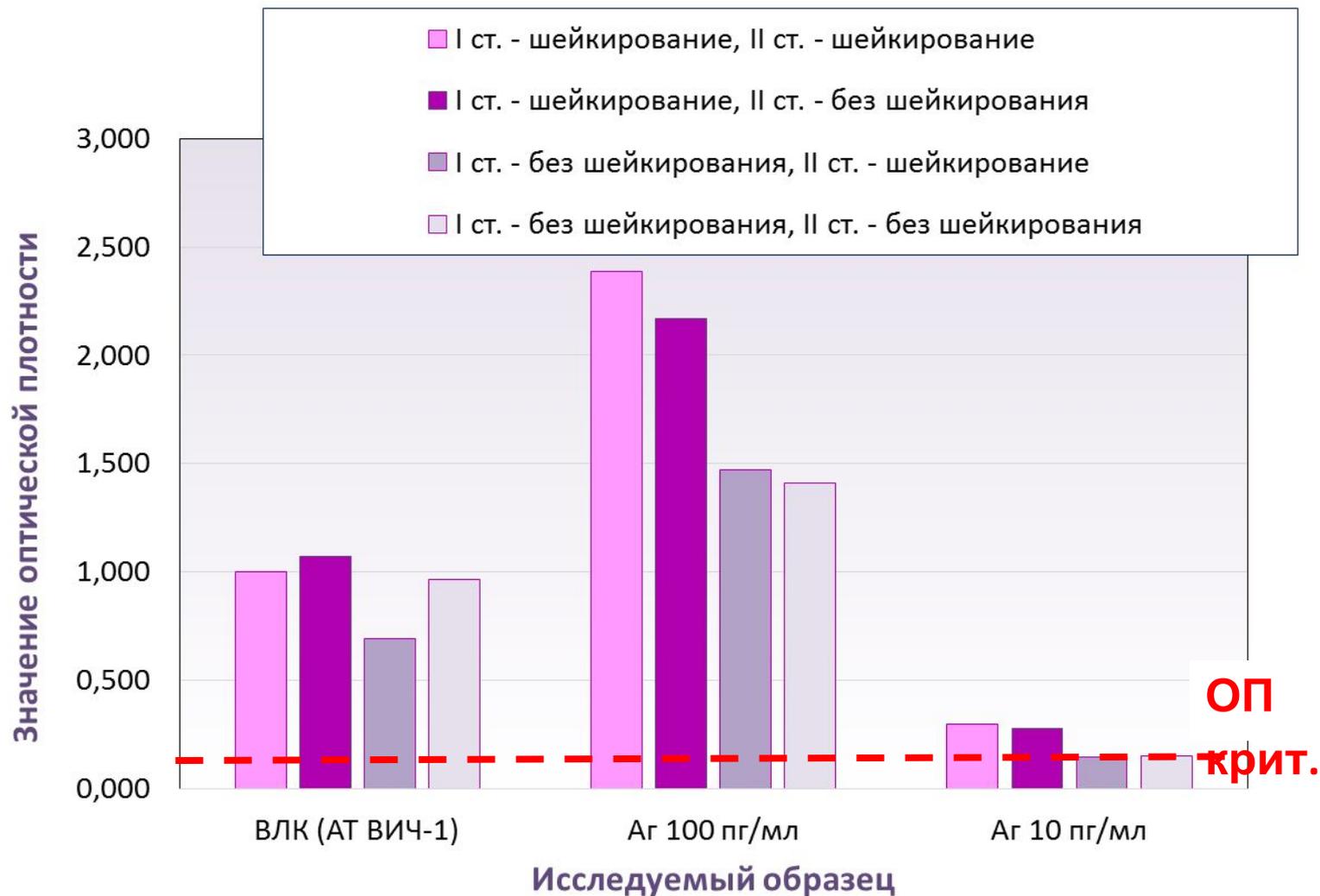
Ложноотрицательные результаты. Способы внесения растворов в лунки планшета

Образец/ Способ внесения в лунку	ВЛК (Ат ВИЧ-1)	Аг 100 пг/мл	Аг 10 пг/мл	МиниПОЛ	Доноры (-)	ОДС
	Значение оптической плотности					
Без перемешивания	1,552	0,658	0,100	0,627	0,032	0,029
С перемешивание М	1,276	1,989	0,253	0,446	0,025	0,014
ОП крит. = 0, 134						



«Содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краям планшета».

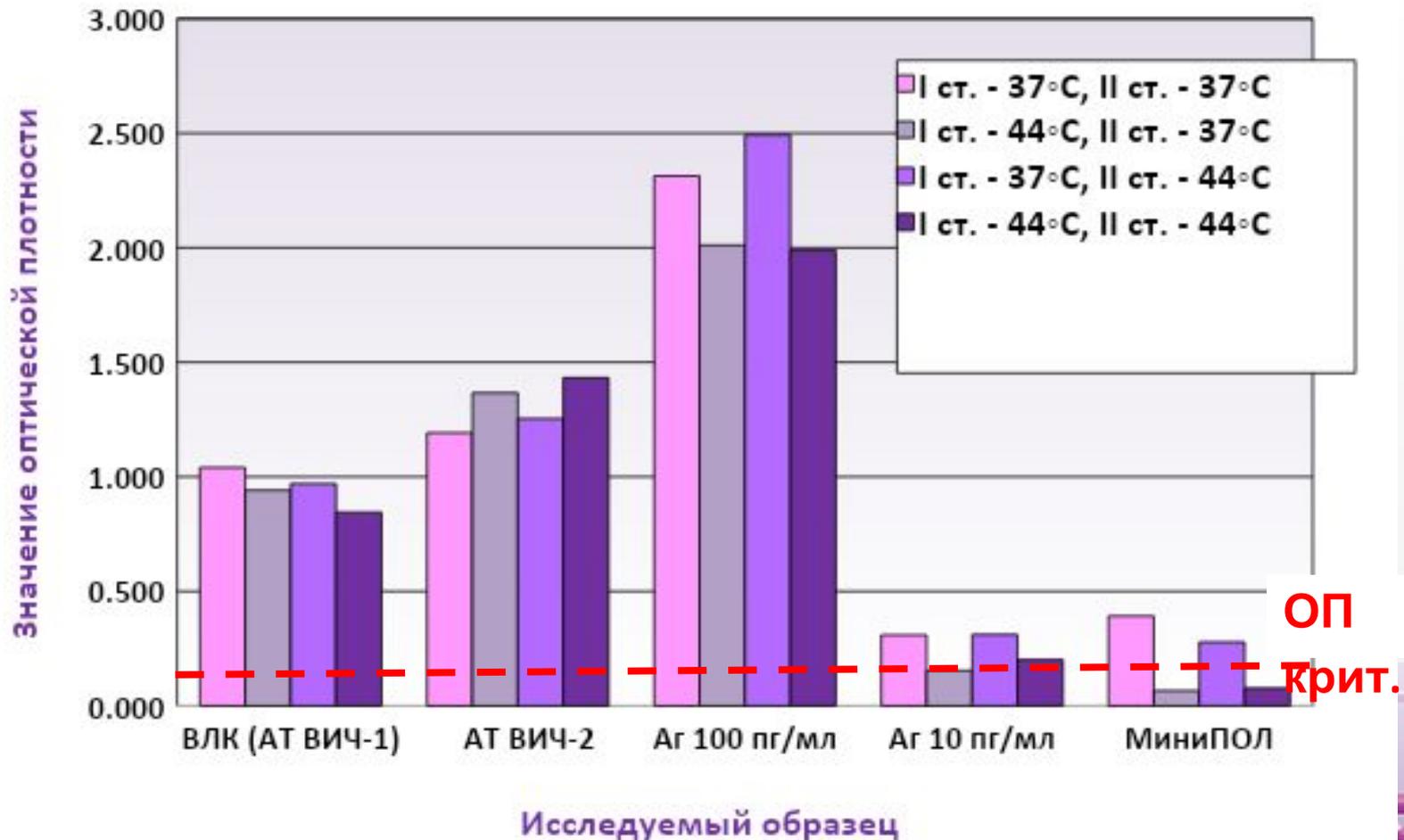
Ложноотрицательные результаты. Нарушение режима шейкирования



Ложноотрицательные результаты. Увеличение времени до внесения раствора хромогена в планшет после промывки

Образец	ВЛК (Ат ВИЧ-1)	Ат ВИЧ-2	Аг 100 пг/мл	Аг 10 пг/мл	МиниПОЛ
Время внесения хромогена	Значение оптической плотности образцов				
Сразу после промывки	1,222	1,654	2,253	0,280	0,417
5 мин. после промывки	1,066	1,463	2,025	0,239	0,370
10 мин. после промывки	0,923	1,372	1,957	0,217	0,335
15 мин. после промывки	0,757	1,100	1,605	0,121	0,232
ОП крит. = 0,124					

Ложноотрицательные результаты. Нарушение температуры инкубации с растворами конъюгатов



Постаналитический этап



Постаналитический этап

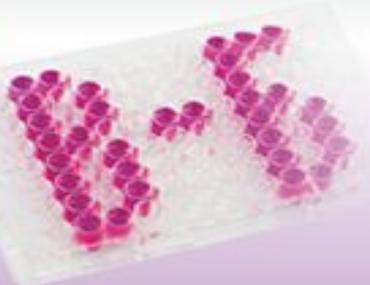
Учет результатов:

- **инструкция** – расчет контрольных значений, критерии валидности теста;
- **визуальный контроль** – загрязнение дна лунки, дефекты пластика, посторонние включения в растворе, загрязнение линзы спектрофотометра;
- **паспорт** – контрольные значения не должны значительно отличаться от указанных в паспорте.

Интерпретация данных:

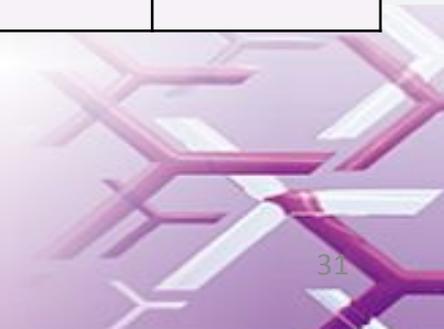
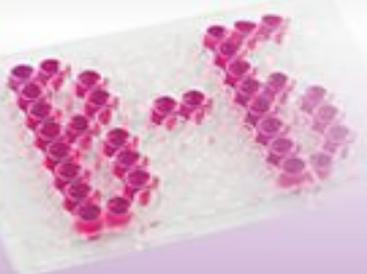
- строго по инструкции;
- выделение «серых зон» (прописаны в СОПах, ссылки на источник).

Канцелярские ошибки



Ложноотрицательные результаты. Образцы с низким содержанием антигена р24

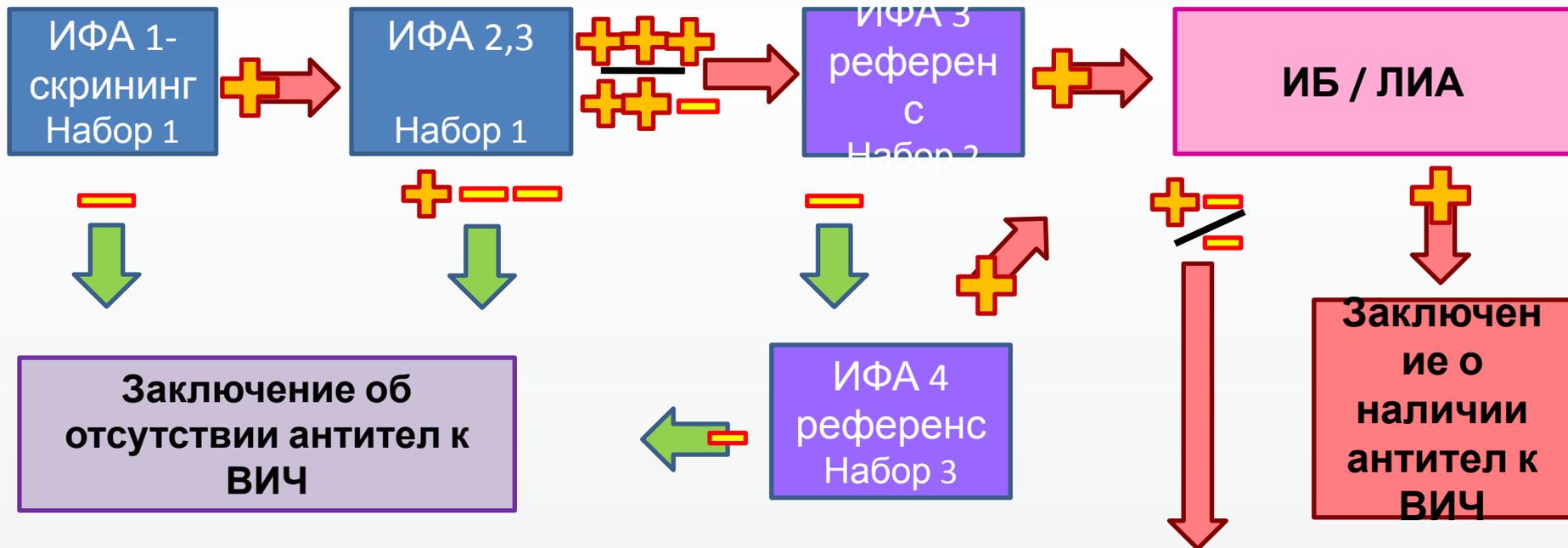
Производитель	АО «Вектор-Бест»			1	2	3
Наименование набора, чувств. по АГ 24	«РеалБест РНК ВИЧ»	«Комби-Бест ВИЧ-1,2 АГ/АТ» 10 пг/мл,	«ВИЧ-1 р24-антиген-ИФА-БЕСТ», 5 пг/мл	5 пг/мл	25 пг/мл	5 пг/мл
ОП образца	Положит.	0,172	0,296 - выявление; 0,051- подтвержд.	0,091	0,193	0,042
ОП крит.		0,173	0,128 / 0,126	0,173	0,317	0,175
К поз. образца		0,99	2,31 / 0,40	0,53	0,61	0,24



В заключение

- Появление ложных результатов при скрининге большого количества образцов сывороток неизбежно и обусловлено конструктивными особенностями иммуноферментных тестов.
- Соблюдение условий, описанных в инструкциях к тест-системам сокращает вероятность появления ложных результатов до минимума; позволяет потребителям реализовать заложенную производителями чувствительность и специфичность.
- Интерпретация результатов ИФА должна осуществляться путём комплексной оценки данных, полученных на всех этапах проведения анализа.
- Проведение мероприятий по контролю качества позволяет выявлять проблемы при проведении анализа и предотвращать появление ложных результатов.

Алгоритм диагностики ВИЧ-инфекции (до внесения изменений)



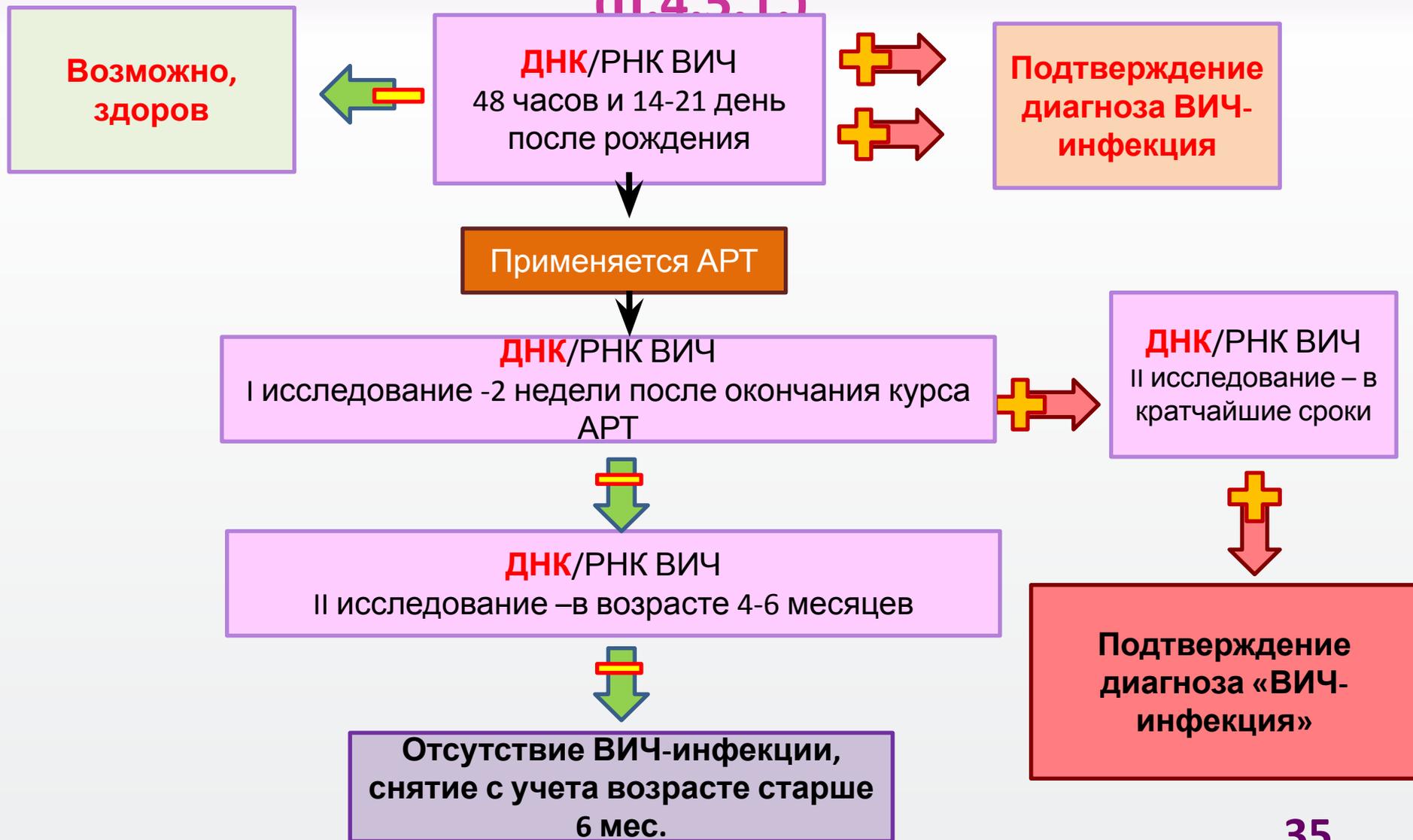
- Дополнительные методы: определение р24 антигена, ПЦР (ДНК/РНК ВИЧ), в случае +результата - повторное обследование в ИБ / ЛИА через 2, 4, 6 недель
- повторное исследование в ИБ (ЛИА) через 2 недели, 3, 6 месяцев

Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.5.2826-10 «Профилактика ВИЧ-инфекции». Утверждены 11.01.2011.

Изменения в СП 3.1.5.2826-10 от 21.07.2016

Диагностика ВИЧ-инфекции у детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями

(п. 4.5.1.)



Снятие с учета детей по перинатальному контакту по ВИЧ-инфекции

Только в возрасте 6 мес. и старше врачебной комиссией при условиях (п. 4.5.2.):

1. ≥ 2 ИФА (-) – **в каком возрасте?**
2. Отсутствие гипогаммаглобулинемии;
3. ≥ 2 ПЦР (-) ДНК или РНК ВИЧ в возрасте 1,5-2 мес. и старше и 4 мес.;
4. Отсутствие грудного вскармливания.
5. Отсутствие клинических проявлений ВИЧ-инфекции;

Ребенок получал грудное вскармливание от ВИЧ-инфицированной матери (п. 4.5.3.):

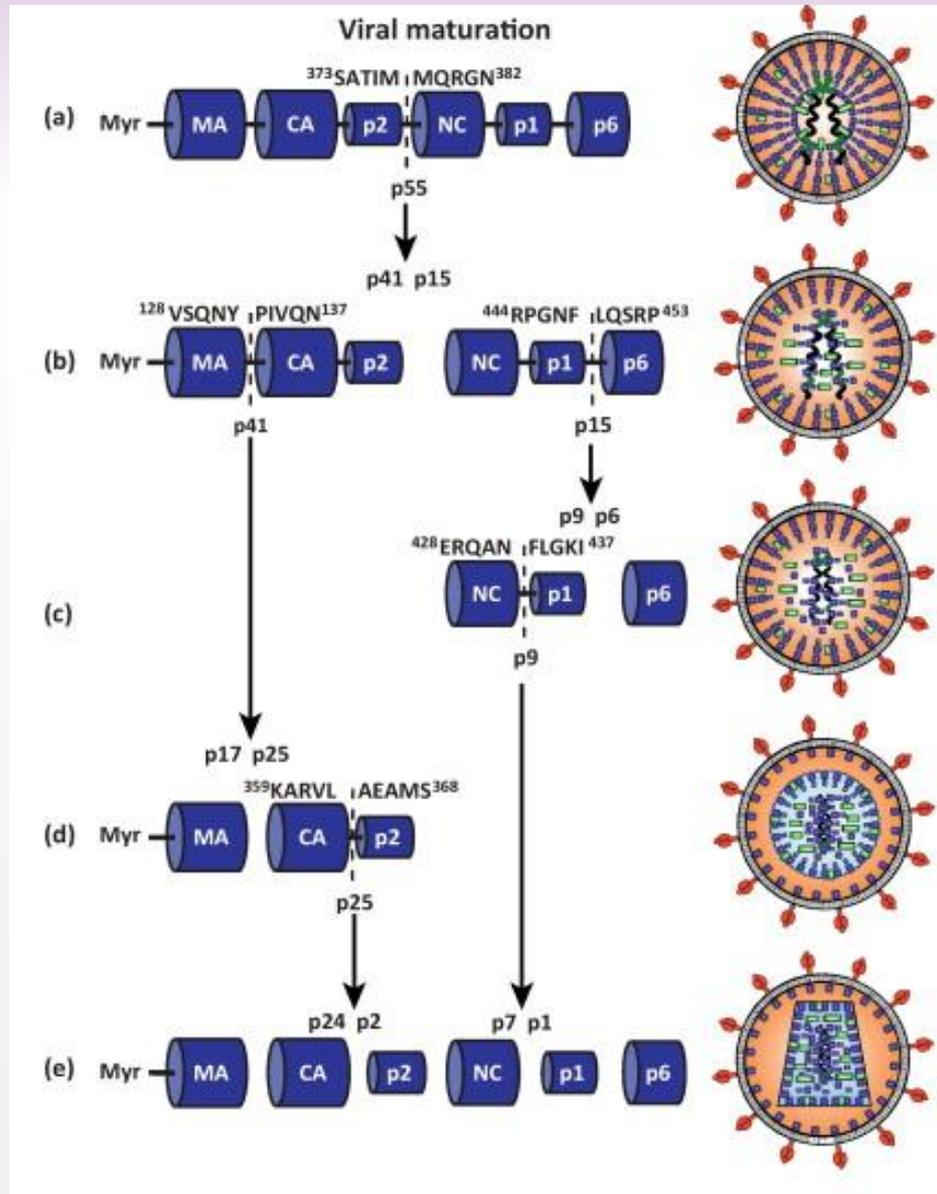
1. Прекращение грудного вскармливания;
2. Обследование ПЦР ДНК или РНК ВИЧ через 4-6 недель, 3 мес. И 6 мес. после прекращения грудного вскармливания;

При достижении возраста 18 месяцев диагностика детей, рождённых ВИЧ-инфицированными матерями, осуществляется так же, как у взрослых (п. 4.5.4).

Изменения СП 3.1.5.2826-10 "Профилактика ВИЧ-инфекции"

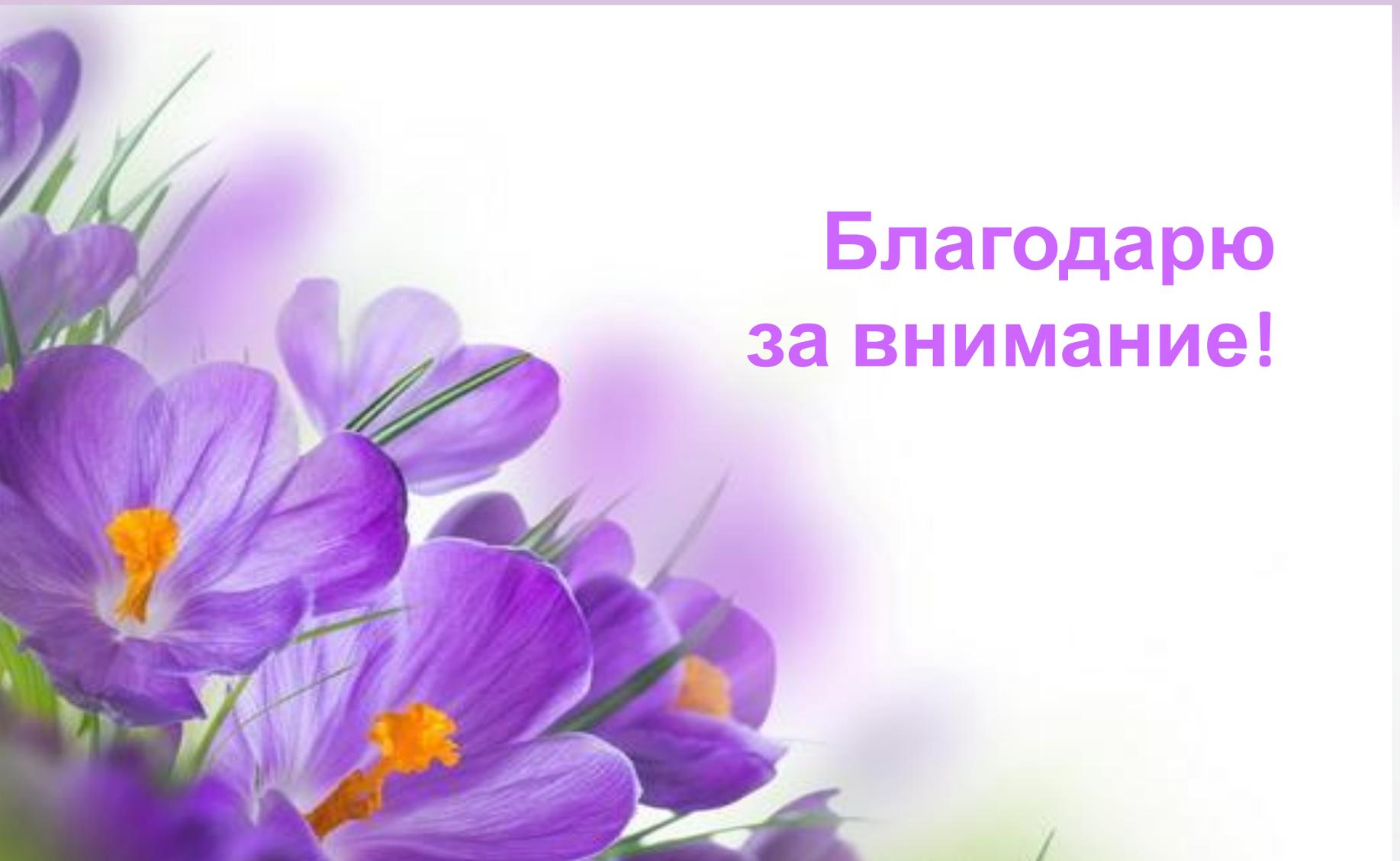
- «Стандартным методом лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции служит **одновременное** определение антител к ВИЧ 1,2 и антигена р 24/**25** ВИЧ с помощью диагностических тестов ИФА и **ИХЛА**»(п. 4.3.).
- Подтверждение результатов скрининга – «используемые вторая и третья тест-системы должны иметь **аналогичные и более высокие аналитические характеристики** (чувствительность, специфичность) по сравнению с скрининговой тест-системой» (п.4.4.2).
- Исправлена ошибка в п. 4.4.3 о критериях положительных результатов блота.
- «Исключить проведение повторных обследований методом ИБ у лиц с установленным ранее диагнозом «ВИЧ-инфекция» (п.4.4.10.).
- «Принять меры по обеспечению сохранности сывороток ВИЧ-инфицированных в течение не менее 1 года с момента постановки диагноза» (п.4.4.11.).
- «Пожизненное отстранение ВИЧ-инфицированных и позитивных в ИФА при референс-исследовании от сдачи крови, плазмы, органов и тканей. **Допускается отмена отстранения от донорства при динамическом наблюдении в случае, если в течение 12 месяцев от донора были получены отрицательные результаты обследования на ВИЧ в ИФА, не были обнаружены ДНК, РНК ВИЧ, отсутствовали факторы заражения**

Gag p 25 – ЧТО ЭТО?

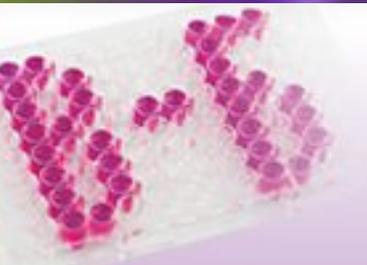


Литература

1. Bell NM, Lever AM. HIV Gag polyprotein: processing and early viral particle assembly. Trends Microbiol. 2013; 21(3):136-44.
2. Bonini PA, Plebani M, Ceriotti F, Rubboli F. Errors in laboratory medicine. Clin Chem. 2002;48:691–8.
3. Chou R, Huffman LH, Fu R, Smits AK, Korthuis PT (July 2005). "Screening for HIV: a review of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force". Ann. Intern. Med. 143 (1): 55–73.
4. Johnson C. Whose Antibodies Are They Anyway? Continuum (London) September/October 1996; 4(3):4-5.
5. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 21.07.2016 N 95 "О внесении изменений в СП 3.1.5.2826-10 "Профилактика ВИЧ-инфекции"
6. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.5.2826-10 «Профилактика ВИЧ-инфекции».
7. Шарипова И.Н., Ходак Н.М., Пузырев В.Ф., Бурков А.Н., Уланова Т.И. Сравнительное исследование специфичности тест-систем для диагностики ВИЧ-инфекции на категории образцов сывороток крови беременных женщин / Клиническая лабораторная диагностика №3, 2015. – с. 38 -41.

A close-up photograph of several purple crocuses with bright yellow centers, set against a soft, out-of-focus background of more flowers and greenery.

**Благодарю
за внимание!**

A small, rectangular microarray chip with a grid of red and white spots, likely used for diagnostic testing.

**Более 25 лет
на рынке
ИФА-диагностики**

