

## Содержание

Сокращения используемые в тексте пособия	3
Вступление	4
Краткие сведения по эпидемиологии, этиологии и патогенезу ВИЧ-инфекции	5
Современные методы лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции	15
DIA-HIV 1/2	23
DIA-HIV p24	31
DIA-HIV Ag/Ab	35
Обсуждение результатов ИФА	40
Литература	48

ГП Научно-технический центр иммунобиотехнологии  
НТК „Институт монокристаллов” НАНУ  
Институт эпидемиологии и инфекционных болезней им.  
Л.В.Громашевского АМН  
АОЗТ НПК «Диапроф-Мед»

## СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

### Практическое пособие

Киев - 2004

УДК 616.98:578.826.6

**Серологическая диагностика ВИЧ-инфекции  
Практическое пособие**

Под редакцией доктора медицинских наук,  
профессора А.Л.Гураля

Авторы: Гураль А.Л., Иванская Н.В., Кислых Е.М.,  
Максименок Е.В., Раевская Г.Е., Михайленко Л.П., Шеховцов В.А.,  
Мезецкая Т.И.

Для врачей-лаборантов, врачей инфекционных и общетерапевтического профиля, эпидемиологов, вирусологов, иммунологов, биологов, студентов высших учебных заведений и аспирантов.

Киев, «Диапроф-Мед», 2004

особо опасных фило-(Эбола, Марбург) и арена-(Ласса, Мачупо) вирусов. – Сб. Санитарная охрана территории Украины и профилактика особо опасных инфекций (материалы научно-практической конф., посвященной 60-летию Украинской государственной противочумной станции). – Одесса, 30-31 окт. 1997 г. – С. 35-50

24. Кислих О.М. Застосування комбінованих антиген-антитільних тестів для імуноферментної діагностики ВІЛ-інфекції // Лабораторна діагностика. - 2003. - N 4. - С. 37-42.
25. Doran T.I., Parra E. // False-positive and indeterminate human immunodeficiency virus test results in pregnant woman. – Archives of Family Medicine, 2000, v.9, pp.924-929.
26. Giles R.E., Perry K.R., Parry J.V. // Simple/rapid test devices for anti-HIV screening: Do they come up to the mark / J. Med. Virol. - 1999. - Vol. 59. - P.104-109.
27. Барбашева Е.В. Изучение биологических свойств вирусов иммунодефицита первого типа, выделенных в Украине. – Автореф. канд. дисс. – Киев. – 1997. – 18 с.
28. Busch M.P., Satten G.A. //Time course of viremia and antibody seroconversion following human immunodeficiency virus exposure / Am. J. Med. - 1997. - Vol. 102. - 117-124.
29. Natarajan V., Waters D., Dewar L. // Quantitation of viremia in human immunodeficiency virus infection by viral RNA estimation / Manual of Clinical Laboratory Immunology, 5-th edition, Washington: ASM Press. - 1997. - P. 773-779.
30. Gao F., Yue L., Robertson D.L.//Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. - J. Virol. - 1994. - V.68. - N 11. - P.P. 7433-7447.
31. Раєвська Г.Є., Грицак Т.Ф., Донська Є.І., та ін. Діагностичні характеристики імуноферментної тест-системи виробництва НВК „Діапроф-Мед” та перспективи розробки нових діагностичних препаратів. Лаб. Діагностика, 2003, № 4, 14-26
32. Аноним. Гарантія якості при лабораторному обстеженні інфікованості вірусом иммунодефіцита человека. Семинар под егідою Європейського бюро Всемирной організації здравоохранения. - Санкт-Петербург. -1993. - 39 С.С.
33. Thorstenson R., Gaines H., Biberfeld G. Large-scale evaluation of an alternative strategy for confirmation of HIV antibodies. - Clin. Diagnost. Virol.- 1995. - V. 4. - N 1. - P. 15-25.
34. Oldstone M.B.A. Viruses and autoimmune diseases. – Scand.J.Immunol., 1997, v.46, N 4, 320-325
35. Владыко А.С. Перекрестная иммунореактивность среди

Сокращения, использованные в тексте данного пособия:

- АОЗГ - акционерное общество закрытого типа;  
 ВИЧ - вирус иммунодефицита человека;  
 ВООЗ - Всемирная организация здравоохранения;  
 ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота;  
 ИБ - иммунный блот, иммуноблот;  
 ИФА - Иммуноферментный анализ;  
 МОЗ - Министерство здравоохранения;  
 НВК - научно-производственная компания;  
 ОФД – ортофенилендиамин (о-фенилендиамин);  
 ПЦР - полимеразная цепная реакция;  
 РНК - рибонуклеиновая кислота;  
 СПИД - синдром приобретенного иммунодефицита (человека);  
 ЮНЕЙДС (United Nations AIDS Program) - объединенная программа Организации Объединенных Наций из проблем ВИЧ/СПИДа;  
 ЛПР - ложноположительные результаты;  
 CDC (USA Centers for Disease Control and Prevention) - Центры США по проблеме контроля и предупреждения заболеваний;  
 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) - твердофазный иммуноферментный анализ;  
 LTR (long terminal repeat) - длинные концевые повторы;  
 ТМВ - 3,3',5,5'-тетраметилбензидин;  
 USA FDA (USA Federal Drug Administration) - Федеральное управление США по вопросам лекарственных препаратов;  
 WB (Western Blot) - иммунный блот, иммуноблот.

## Введение

Человечество вступило в новое тысячелетие с многочисленными проблемами, которые приходится решать без промедлений; к таким проблемам относятся, в частности, инфекционные болезни. Успехи, достигнутые в профилактике и лечении некоторых инфекционных заболеваний в XX столетии, одно время давали надежды на успешное решение этой проблемы. Однако новая волна уже якобы побежденных недугов и особенно появление инфекции, вызванной вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) в начале 1980 х гг., коренным образом изменила эти представления. Сегодня понятно, что "болезнь века" представляет угрозу не только здоровью отдельного человека, но и выживанию всего человечества [1].

ВИЧ-инфекция стала одной из важнейших и наиболее актуальных медико-социальных проблем нашей страны. Борьба с ВИЧ-инфекцией и синдромом приобретенного иммунного дефицита (СПИД) в Украине давно уже получила статус общегосударственной приоритетной программы. Начиная с 1987 г., внимание Министерства здравоохранения (МЗ) нашей страны обращено на максимальное выявление ВИЧ-инфицированных и больных СПИДом лиц, как среди жителей Украины, так и среди иностранных граждан, прибывающих в нашу страну; это особенно касается определенных прослоек населения, принадлежащих к группам повышенного риска инфицирования. Отработана система эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией, организована сеть диагностических лабораторий, кабинетов доверия, областных и городских центров профилактики и борьбы со СПИДом. Неоднократно создавались и совершенствовались директивно-методические документы. Верховная Рада Украины приняла закон "О мерах по предотвращению заболевания СПИДом и социальная защита населения".

Тем не менее распространение ВИЧ-инфекции/СПИДа продолжается. Поэтому не исчезает потребность в диагностических средствах и методах выявления ВИЧ-инфекции. Лабораторная диагностика ВИЧ-инфекции - это один из важнейших элементов Всемирной программы борьбы со СПИДом, разработанная ВОЗ (Global programme on AIDS, WHO, Geneva). Стандарт, на который

progression to AIDS, and survival: comparison with viral RNA measurement / J. Infect. Dis. - 2000. - Vol. 181, N 4. - P. 1280-1288.

13. Barre-Sinoussi F., Cherman J.C., Rey F. et al. // Isolation of T-lymphotropic retrovirus from patient at risk of AIDS / Science. - 1983. - Vol. 220. - P. 868-871.

14. Букринская А.Г., Жданов В.М. Молекулярные основы патогенности вирусов. - М., "Медицина", 1991, 256 с.

15. Sharp P.M., Robertson D.L., Gao F. Origins and diversity of human immunodeficiency virus. - AIDS. - 1994. - V.8. - P.527-542.

16. Shioda T., Oka S., Ida S. A naturally occurring single basic amino acid substitution in the V3 region of the human immunodeficiency virus type 1 Env protein alters the cellular host range and antigenic structure of the virus. - J.Virol. - 1994. - V.68. - N 12. - P.7689-7696.

17. Іванська Н.В., Кислих О.М., Максименок О.В., Сергеева Т.А., Раєвська Г.Є., Пилипенко В.Г. Практичний посібник з імуноферментного аналізу. - Київ, 2003. - 47 с.

18. Самуилов В.Д. Иммуноферментный анализ. - Соросовский общезобразовательный журнал. - 1999. - № 2-3. - С.39-42.

19. Ly T.D., Laperche S., Courouce A.M. Early detection of human immunodeficiency virus infection using third- and fourth-generation screening assays // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. - 2001. - Vol. 20, N 1. - P. 104-110.

20. Ledergerber B., Flepp M., Boni J. et al. // Human immunodeficiency virus type 1 p24 concentration measured by boosted ELISA of heat-denaturated plasma correlates with decline in CD4 cells, progression to AIDS, and survival: comparison with viral RNA measurement / J. Infect. Dis. - 2000. - Vol. 181, N 4. - P. 1280-1288.

21. Gurtler L., Muhlbacher A., Michl U. et al. // Reduction of the diagnostic window with a new combined p24 antigen and human immunodeficiency virus antibody screening assay / J. Virol. Meth. - 1998. - Vol. 75. - P. 27-38.

22. Meier T., Knoll E., Henkes M. et al. // Evidence for a diagnostic window in fourth generation assays for HIV / J. Clin. Virol. - 2001. - Vol. 23, N 1-2. - P. 113-

23. Раєвська Г.Є., Співак М.Я. Сучасні методи лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції. - Мікробіол. ж. - 2000. - Т.62, № 4. - С. 56-65.

мы должны сегодня ориентироваться, - это мировой уровень диагностических исследований [2].

Ежегодно в нашей стране проводится около 4 млн. исследований ВИЧ-инфекции, включая обследование 2 млн. доноров и около 1,5-2 млн. человек по клиническим и эпидемиологическим показателям; это, в частности, касается определенных групп населения во многих регионах Украины. Основные нужды клиничко-диагностических лабораторий в Украине обеспечиваются тест-системами производства АОЗТ НПК «Диапроф-Мед», предназначенными для выявления антител против ВИЧ в сыворотках крови. Ниже мы детально опишем особенности работы с этими тест-системами, предварительно коротко остановившись на вопросах эпидемиологии, этиологии, патогенеза и общих проблемах диагностики ВИЧ-инфекции.

### Краткие сведения об эпидемиологии, этиологии и патогенезе ВИЧ-инфекции

Международные организации ВОЗ и ЮНЕЙДС характеризуют ситуацию с ВИЧ-инфекцией/СПИДом в мире как пандемию, которая охватила все страны и континенты, приведя к катастрофическим последствиям и крайне неблагоприятным демографическим изменениям во всех странах, особенно африканских. Количество ВИЧ-инфицированных в мире достигло 60 млн. человек, из них около 25 млн. умерли от СПИДа. Каждый год в мире дополнительно выявляют 5 млн. ВИЧ-инфицированных и более 2 млн. человек гибнет от СПИДа [1].

Распространение ВИЧ-инфекции/СПИДа не обошло и Украину, которая на сегодня по темпам развития эпидемии вместе с Российской Федерацией занимает одно из ведущих мест среди стран Восточной Европы. По данным сероэпидемиологического мониторинга, распространение ВИЧ-инфекции в Украине не уменьшается. По состоянию на 01.07.2004 г. выявлено 122.026 ВИЧ-положительных лиц, из которых, по крайней мере, две трети принадлежат к инъекционным наркоманам, а 80 % - это лица в

### ЛИТЕРАТУРА

1. ЮНЕЙДС. Развитие эпидемии СПИДа: состояние на декабрь 2002 г.
2. Metcalf J.A., Davey T.Jr., Clifford H.L. Acquired immunodeficiency syndrome: serologic and virologic tests //AIDS: Biology, Diagnosis, Treatment, and Prevention, 4-th edition.- Lippincott-Raven Publishers. -1997.- P. 177-193.
3. Покровский В.В. Эпидемиология и профилактика ВИЧ-инфекции и СПИД. - М.: "Медицина". - 1996. - С. 25-41.
4. Nermut M.V., Hockley D.J. Comparative morphology and structural classification of retroviruses. - 1996. - Curr.Top.Microbiol.Immunol. **214**: 1-24.
5. Носик М.Н., Малевич Г.Р. Хемокиновые рецепторы ВИЧ-1 и их роль в патогенезе СПИДа / Вопр.вирусол. - 2001. - N 1. - С.4-8.
6. Кульберг А.Я., Быковский А.Ф., Покровский В.И. Молекулярные основы патогенеза СПИД. - ЖМЭИ. - 1989. - № 10. - С.С.28-35.
7. Gelderblom, H.R. Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function / AIDS. - 1991. - P. 617-637.
8. Saag M.S., Hahn B.N., Gibbons G. et al. // Extensive variation of human immunodeficiency virus type-1 in vivo / Nature. - 1998. - VOL. 334, N 6181. - P. 440-444.
9. Полянова М. Генетичного разнообразие при вирусите щамове HIV - основен проблем за създаване на успешна ваксина / Инфектология (София, Болгария). - 1999. - Т. 36, N 4. - С. 3-8.
10. Levy J.A. HIV and the Pathogenesis of AIDS. - 1994. - ASM Press, Washington, D.C. - 359 p.
11. Покровский В.В., Ермак Т.Н., Беляева В.В., Юрин О.Г. // ВИЧ-инфекция: клиника, диагностика и лечение / М.: "Гэотар Медицина", 2000. - 489 с.
12. Ledergerber B., Flepp M., Boni J. et al. // Human immunodeficiency virus type 1 p24 concentration measured by boosted ELISA of heat-denaturated plasma correlates with decline in CD4 cells,

возрасте 20-39 лет. Общее число ВИЧ-инфицированных составляет около 1 % населения в возрасте 15-49 лет.

Сегодня в распространении эпидемии ВИЧ-инфекции/СПИДа в Украине наибольшую роль играет парентеральный путь передачи возбудителя (введение наркотиков загрязненными шприцами). Инъекционные наркоманы дальше распространяют заболевание среди своих половых партнеров. После 1995 г. все больше возрастает значение полового пути передачи инфекции, увеличивается число ВИЧ-инфицированных женщин и возможность заражения ребенка от матери. [3]. Вместе с тем, широкое внедрение современных методов диагностики и профилактики способствует уменьшению числа случаев передачи ВИЧ от матери к ребенку.

ВИЧ/СПИД принадлежит к вирусным заболеваниям; его возбудитель – один из многочисленных представителей семейства ретровирусов. На сегодня различают два основных типа вируса – ВИЧ-1 и ВИЧ-2, отличающихся по своей структуре и антигенным свойствам, а также течением вызванной ими болезни. Для ВИЧ характерны совершенный аппарат генетического паразитизма, чрезвычайно сложная регуляция репродуктивного цикла и высокая изменчивость (рис. 1) [4].

Вирион сферической формы, диаметр его 100-150 нм. Внешняя оболочка вируса состоит из липидов клеточной мембраны хозяйского происхождения. В эту мембрану встроены рецепторные структуры (шипы) похожие на гриб. "Шапочку гриба" образуют молекулы гликопротеина gp120, имеющего родство с клеточными рецепторными молекулами CD4. "Ножка гриба" состоит из четырех молекул гликопротеина gp41, встроены в мембрану. Под внешней оболочкой располагается сердцевина вируса (core) в форме конуса, образованная белком р24. Белок р24 слабо взаимодействует с другими белками вириона, а потому под действием неонных детергентов значительная часть белка р24 оказывается в растворе. Белок р24 обнаруживают уже на ранних стадиях развития инфекции в пораженном организме. Расстояние между внешней вирусной мембраной и сердцевиной заполнено матричным белком р17.

необходимо иметь в виду, что разные диагностические методы целесообразно использовать в комплексе, а не увлекаться одними в ущерб другим.

Из приведенных данных вытекает, что ИФА может быть чрезвычайно полезным вспомогательным средством при постановке диагноза, но клиницист должен принимать во внимание много других обстоятельств, помимо данных лабораторного анализа. Лишь всестороннее обследование больного и внимание ко всем данным анамнеза позволяет корректно поставить диагноз и начать правильное лечение.

иммуноферментных тест-систем значительно меньшая, чем при использовании метода иммунного блота.

В Украине, соответственно действующей "Инструкции по организации работы лабораторий диагностики ВИЧ-инфекции" (Приказ МОЗ Украины № 71 от 22.02.02 г.), подтверждающие исследования на наличие антител к ВИЧ проводят в два этапа. На первом этапе первично-положительный образец сыворотки для исключения ЛПР скринингового исследования анализируют с помощью 2-х разных тест-систем с разными антигенами и/или разного формата и принципа действия. Положительный результат в обеих тест-системах свидетельствует о наличии антител к ВИЧ в исследуемом образце. На втором этапе подтверждающих исследований устанавливают диагноз "ВИЧ-инфекция" (лабораторно) лицу, которое имеет справку о наличии антител к ВИЧ для установления его на учет в соответствующем медицинском учреждении. На этом этапе подтверждающих исследований образец сыворотки анализируют с помощью метода иммунного блота. Этот метод применяют также при обследовании лиц с сомнительными (неопределенными) результатами тестирования, детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями и в некоторых других случаях. При отсутствии возможности подтвердить наличие антител к ВИЧ методом иммунного блота, в соответствии с рекомендациям экспертов ВОЗ и действующей "Инструкцией по организации работы лабораторий диагностики ВИЧ-инфекции", для установления диагноза "ВИЧ-инфекция" (лабораторно) необходимо применить 3 разные иммуноферментные тест-системы.

Скрининговым обследованиям на ВИЧ в Украине на сегодняшний день подлежат граждане, определенные Законом Украины "О предотвращении заболевания на СПИД и социальная защита населения" (1991), дополнениями к этому Закону (1998), "Правилами медицинского осмотра с целью выявления ВИЧ-инфекции, учета ВИЧ-инфицированных и больных СПИДом и медицинского надзора за ними".

Только на основании комплексного обследования пациента, включающего эпидемиологический и клинический анамнез, врач может сделать вывод о наличии ВИЧ-инфекции и осознание этого очень важно для специалистов лабораторной службы. При этом

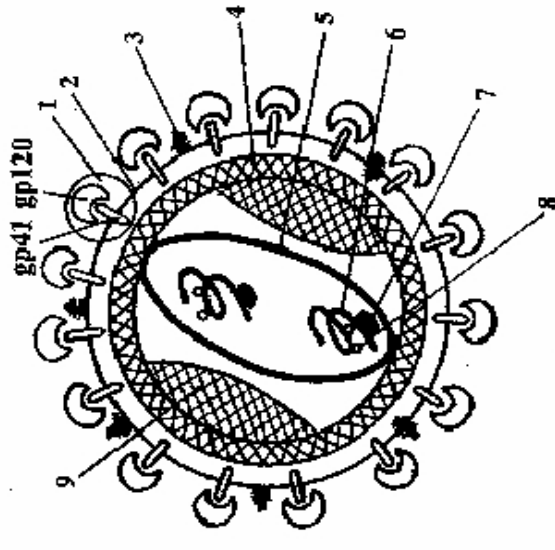


Рис. 1 Схема строения вируса иммунодефицита человека [4]:

- 1- внешний отросток оболочки ВИЧ (gp120, gp41);
- 2- мембрана вириона (клеточного происхождения);
- 3- оболочковые белки (HLA и др.);
- 4- матричный пласт (p17);
- 5- оболочка нуклеоида (p24);
- 6- геномная РНК (две одноцепочечных молекулы);
- 7- ферменты комплекса интеграции;
- 8- нуклеопротеин; 9- латеральные тельца.

Внутри сердцевины лежат две тождественные молекулы вирусной РНК, структурированных низкомолекулярными белками - р9 и р7. Каждая молекула РНК несет 9 генов ВИЧ. Три из них - gag, env и pol - кодируют структурные вирионные белки. Существует три регуляторных гена: tat, rev, nef, а также три дополнительных гена: vif, vpr, vif. Эти гены несут информацию по синтезу белков,

необходимых для размножения и выживания вируса. Концы каждой молекулы РНК имеют последовательности, названные длинными концевыми повторами (long terminal repeat, LTR). Участки LTR действуют как переключатели для управления процессом вирусной транскрипции; они взаимодействуют и с белками ВИЧ, и с белками клеток хозяина.

Кроме молекул РНК, в сердцевине вириона содержится несколько молекул ревертазы, кодированной геном *pol* (этот фермент состоит из двух субъединиц - *p64* и *p53*), эндонуклеазы (интегразы) *p31* и протеазы *p22*. Все эти белки необходимы для начала репликации и ее этапов. Обратная транскриптаза (ревертаза) осуществляет синтез вирусной ДНК на матрице вирусной РНК. Эндонуклеаза встраивает вирусную ДНК в геном клетки-хозяина, вследствие чего образуются провирус. Протеаза принимает участие в "нарезании" предшественников вирусных белков при созревании новой вирусной частицы.

Вирионная РНК, связанная с белками нуклеокапсида, располагается в нуклеоиде не точно по центру, а немного смещена, "эксцентрично". В сердцевине зрелых вирусных частиц содержится также регуляторный белок *vif* (продукт одноименного гена), являющийся трансактиватором процесса трансляции РНК из вирусных генов в начале нового цикла репликации, до момента когда в зараженной клетке успевают синтезироваться другой вирусоспецифичный трансактиватор - белок *tat*. В инфицированных клетках находят также регуляторные белки - *vif*, *pol*, *vif*, *pol*, *vif* или *vif*, которые не входят в состав вирионов; это так называемые неструктурные вирусные белки, регулирующие репродукцию ВИЧ.

Как и все вирусы, ВИЧ может размножаться только в хозяйских клетках, причем способен проникать лишь в такие клетки, которые имеют на поверхности определенные соответствующие рецепторы (например, CD4, CXCR-4, CCR-5). Проникновение вируса в клетку происходит после присоединения его к клеточной поверхности; при проникновении происходит "разделение" вирусной частицы и выход молекул РНК в цитоплазму. Здесь проходит первый этап жизненного цикла ВИЧ - обратная транскрипция, т.е. синтез двухцепочечной ДНК на матрице вирусной РНК при участии фермента ревертазы. Образованная провирусная ДНК проникает в ядро клетки, где с помощью другого фермента - интегразы -

системы следует предварительно проверять в лаборатории, где ими будут пользоваться, и на образцах сывороток, полученных именно от того контингента обследуемых лиц, с которым в дальнейшем будут работать.

В общем, перспективы повышения эффективности борьбы с ВИЧ-инфекцией в значительной мере связаны с внедрением современных методов серологической диагностики - определением специфических антител с помощью иммуноферментного анализа. Серологические обследования на наличие антител к ВИЧ проводятся в рамках скрининговых исследований и определяют уровень распространения ВИЧ-инфекции, служат показателем инфицированности среди отдельных контингентов обследуемых лиц. Скрининговые исследования носят многоэтапный характер (первичные и подтверждающие) и направлены не только на выявление заболевания и его распространение, но и на более углубленное обследование с целью уточнения диагноза и принятия решения о необходимом медицинском вмешательстве.

На сегодня существует несколько методических подходов по проведению скрининговых исследований ВИЧ-инфекции. В соответствии с рекомендациями ВОЗ (1997), обследования проводятся с целью обеспечения трансфузионных/трансплантационных мероприятий (безопасность донорской крови, ее продуктов, тканей, органов, спермы, яйцеклеток), диагностики ВИЧ-инфекции и эпидемиологического надзора. Эти стратегии определяют порядок проведения первичных и подтверждающих (верификационных) исследований при тестировании разных групп населения в зависимости от цели обследования и уровня распространения ВИЧ-инфекции без применения ИБ. Подтвердить наличие антител к ВИЧ в первично-положительном образце сыворотки возможно путем применения комбинации иммуноферментных тест-систем. Для исключения ЛПП, тест-системы, используемые для подтверждающих исследований, должны отличаться от скрининговых тест-систем антигенами ВИЧ, нанесенными на твердую фазу (дно лунки микропланшета или полистиролового шарика) и/или форматом исследований (планшетный или шариковый), и/или принципом действия диагностики (прямой, непрямой, сандвич, конкурентный ИФА). Стоимость подтверждающих исследований с помощью комбинации



результата. Создается впечатление, что ЛПР встречаются при многочисленных ситуациях, причастных к поликлональной активации В-лимфоцитов, когда независимо от фактора, который вызвал такую активацию, синтезируется много видов антител.

Другие возможные причины ЛПР - прогревание исследуемых сывороток, наличие в сыворотках антител против углеводов, случаи пассивной иммунизации (это особенно касается препаратов антител, изготовленных до 1985 г.), высокие уровни антител и иммунных комплексов, которые циркулируют в крови, высокое содержание липидов и билирубина в исследуемых сыворотках, постановка реакции с гемолизированными сыворотками.

Следует сказать также и о возможных ложноотрицательных результатах тестирования. Чуть ли не важнейшая причина их - недостаточная чувствительность тест-системы и отсутствие на твердой фазе именно тех антигенов, против которых в данном случае возникли антитела. Возможно носительство возбудителя без клинических проявлений болезни и без синтеза антител. Не исключен отрицательный результат исследования в случаях, когда пробы крови берут в период сероконверсионного "окна", когда в зараженном организме еще нет специфических антител, а также в терминальной стадии некоторых болезней при тяжелом поражении иммунной системы. Еще одна причина ложноотрицательных результатов, вероятно, может заключаться в недостаточной специфичности применяемого конъюгата антител с ферментом, поскольку в большинстве диагностических систем используют конъюгат против IgG; при этом не берется во внимание наличие в крови специфических IgM и IgA [2,10,11,30].

Согласно рекомендациям ВОЗ, предлагаемые диагностические системы должны предварительно оцениваться именно в условиях работы данной клинической лаборатории, в тех условиях и в тех странах (регионах), где их намерены широко применять, не считаясь с безупречной репутацией хорошо известной фирмы-производителя. Результаты, получаемые в данной лаборатории при проведении анализов, могут существенно образом зависеть от местных условий (контингента обследуемых лиц, методов получения и хранения сывороток, качества воды, температуры окружающей среды и т.п.). Диагностические тест-

встраивается в одну из хромосом хозяйской клетки. После встраивания провирусной ДНК в хромосомную ДНК клетка навсегда становится носителем генетической информации ВИЧ; после деления клетки, все ее потомки также будут содержать полную генетическую информацию, необходимую для размножения ВИЧ [5,6].

Дальнейший этап жизненного цикла ВИЧ происходит в ядре клетки: под действием клеточных ферментов, РНК-полимераз, синтезируется РНК на матрице провирусной ДНК ВИЧ. Синтезированные компоненты ВИЧ - вирусные РНК и белки - составляют вирусные частицы на плазматической мембране. После "упаковки" рибонуклеопротеина незрелый вирион отрывается от поверхности клетки, захватывая часть мембраны с клеточными белками и липидами [7]. В одной инфицированной клетке может образовываться несколько сотен новых вирионов. Как считают исследователи, все ретровирусы, среди них и ВИЧ, проходят три функциональных состояния после завершения вирусспецифических синтезов в клетке: сборку, созревание и старение [7].

Способность изолятов ВИЧ инфицировать разные типы клеток очень неодинакова. Различают моноцито/макрофаготропные (М-тропные) и Т-тропные изоляты. В ходе развития ВИЧ-инфекции М-тропные штаммы ВИЧ, которые преобладают в начале болезни, заменяются штаммами с двойственным тропизмом, а потом окончательно вытесняются Т-тропными штаммами, доминирующими на финальных стадиях заболевания СПИДом [8,9].

Основной признак ВИЧ-инфекции - иммунный дефицит с многочисленными нарушениями, не установленными при рождении и не унаследованными от родителей и который развивается лишь под действием занесенного извне инфекционного фактора у лиц без любых признаков первичного иммунного дефицита. В основе всех патологических процессов, которые происходят при ВИЧ-инфекции, лежит экспрессия вирусных генов. Определенные вирусные белки (например, продукт гена tat), экспрессируясь в клетках CD4<sup>+</sup>, понижают способность этих клеток отвечать на антигены и таким образом обуславливают иммунный дефицит. Исследователи указывают на прямое цитопатическое и

нецитопатическое действие ВИЧ, включая активацию Т-клеток и ВИЧ-специфический иммунный ответ (гуморальный и клеточный иммунитет), аутоиммунные механизмы, влияние суперантитенов и апоптоз [10,11].

До конца не понятно, насколько стойкость против ВИЧ обусловлена наличием антител. В большинстве случаев в ходе ВИЧ-инфекции образуются антитела против оболочечных и других вирусных белков. Падение уровня сывороточных антител против белков *gag* сопровождается, как правило, прогрессированием болезни. Однако вирус нейтрализуют именно антитела, направленные против белков *env*. Стоит вопрос о том, почему же вирусные частицы избегают нейтрализации и почему антитела не дают надежной защиты против ВИЧ. Одним из убедительных ответов на этот вопрос может быть очень быстрый темп изменчивости ВИЧ, за которым не успевает крайне измененная иммунная система инфицированного организма [11].

Изменчивость ВИЧ и все разнообразие патологических изменений, которые вызывают вирусные квазивиды в культивируемых клетках и в организме, приводят к большому разнообразию клинических проявлений болезни в зависимости от особенностей вируса-возбудителя, особенностей зараженного организма и от этапа развития болезни. В ходе ВИЧ-инфекции в организме заражаются миллионы клеток, происходят бесконечные репликационные циклы, которые сопровождаются значительным выходом вирионов из еще жизнеспособных клеток, а временами и гибелью пораженных клеток [9,12,13].

Основной причиной, которая обуславливает очень высокую изменчивость ВИЧ, как и изменчивость некоторых других известных ретровирусов, является отсутствие в их геномах механизмов коррекции. Из-за этого при функционировании вирусных ферментов (эндонуклеазы, обратной транскриптазы) возникает большое количество ошибок, которые приводят к возникновению мутаций. В жизненном цикле ВИЧ есть по крайней мере три стадии, где могут происходить точечные мутации: считывание информации с геномной РНК на минус-цепь ДНК, синтез на ней плюс-цепи ДНК при образовании провируса и, в конце концов, транскрипция РНК. По имеющимся подсчетам, в геноме ВИЧ за один цикл репликации возникает 8-10 мутаций; при

инфекции на ранней ее стадии, но и на наличие другого, нераспознанного еще ретровируса, который сохранил (или приобрел) схожесть с ВИЧ в ходе эволюционного развития. Такая положительная реакция может фиксироваться из-за наличия у ретровирусов определенных областей со сравнительно малой изменчивостью генома (при огромной изменчивости ретровирусных геномов в целом). Как известно, ретровирусы причастны к возникновению многих неопластических процессов и опухолей; часть вирусного генома при этом присутствует в трансформированной клетке (интегрированная в ее геном). В результате в такой клетке могут экспрессироваться и этой клеткой секретируются белки, кодируемые определенными ретровирусными последовательностями, на которые организм отвечает синтезом антител. Подобные случаи описаны при множественных бородавках, множественных миселомах, злокачественных заболеваниях крови и лимфы. Положительную реакцию с сердцевинными белками ВИЧ-1 дают 24 % больных с подкожной Т-клеточной лимфомой, лимфопролиферативными болезнями.

Кроме того, появление в организме ВИЧ-подобных белков и синтез антител против них происходит при состояниях, связанных с аутоиммунными проявлениями, например, при беременности (особенно многоплодной), при системной красной волчанке, склеродерме, многочисленных заболеваниях соединительной ткани, дерматомиозите, хроническом полиартрите, вызванном синдромом Шегрена, рассеянном склерозе (когда находят антитела против ВИЧ-1, ВИЧ-2 и другого человеческого ретровируса, HTLV-1), при наличии ревматоидного фактора, и с аутоиммунными реакциями при недугах, которые первично якобы не имеют аутоиммунного характера (проказа, когда синтезируются аутоантитела против коллагена, малярия, лейшманиоз, туберкулез, разнообразная инфекционные гепатиты и алкогольный гепатит, ослабленная работа почек). Так, по сводным данным, существует около 70 болезней или других факторов, которые приводят к получению ложноположительных результатов при исследовании серологическими методами, с ИФА включительно. Чем с большим числом чужих антигенов и возбудителей контактирует обследуемое лицо, тем большая вероятность получения ложноположительного

особенности, которые дают возможность для определенной имитации. Мысль о том, что антигенная мимикрия состоит в сходстве линейной последовательности аминокислот или зависит от конформационного сходства, возможная даже когда речь идет о структурах совсем разного происхождения, например, об антигенных детерминантах вируса и хозяина. Перекрестную реактивность такого типа между антителами против разных белков установили в опытах с гуморальным и клеточным иммунным ответом. Компьютерные сравнения тоже показали мимикрию между вирусными и хозяинскими белками. Эти данные совокупно с данными о последовательностях белков (пептидов), связанных, по результатам рентгеноструктурного анализа, с белками основного комплекса гистосовместимости (КГС) классов I и II, подтверждают такую гипотезу. Например, наблюдается молекулярная мимикрия между трансальдозой человека, которая селективно экспрессируется в олигодендроцитах, и белками *gag* лимфотропного вируса человека - ВИЧ-1 [34].

ЛПР может возникнуть из-за присутствия в исследуемых сыворотках каких-то других "естественных антител" против неизвестных антигенов; отсюда плохо понятные во многих случаях перекрестные реагирования. В некоторых случаях, правда, причина таких результатов выяснена и доказано наличие антигенной мимикрии. Так, понятия причины появления ЛПР при определении антител против ВИЧ у лиц, больных шистозоматозом, поскольку выявлены тождественные эпитопы у очень отдаленных представителей живого мира - гельминта *Schistosoma mansoni*, распространенного в странах с жарким климатом, и ВИЧ-1. Идентифицирован общий для обоих видов В-эпитоп, состоящий из 14 аминокислот. Моноклональные антитела против этого эпитопа реагируют и с поверхностным антигеном *Sch.mansoni*, и с ВИЧ-1 (с его регуляторным белком *vif*) [35].

Есть также немало случаев присутствия в сыворотках крови антител против родственных вирусов. Например, ЛПР при определении антител против ВИЧ можно получить при наличии в организме некоторых других ретровирусов. Положительная реакция с сердцевинными белками ВИЧ при проверке данных ИФА в иммуноблоте может указывать не только на присутствие ВИЧ-

этом подсчитано, что частота мутаций в геноме ВИЧ-1 на один нуклеотид составляет  $3 \times 10^5$  [14].

Как сегодня уже доказано при детальном анализе нуклеотидных последовательностей многих изолятов, ВИЧ-1 и ВИЧ-2 тоже возникли благодаря изменчивости своих предшественников – инфекционных агентов, которые вызывают иммунодефицит у шимпанзе и у низших обезьян – мангабеев и мандрилов. ВИЧ-1 происходит от *SIV<sub>cpz</sub>* шимпанзе, а ВИЧ-2, менее вирулентный – от низших обезьян. Считают, что штаммы ВИЧ-1 впервые попали в человеческую популяцию в 1920-1930 годах. Три отдельных группы ВИЧ-1 – O, M и N – возникли от трех начальных штаммов *SIV<sub>cpz</sub>*, каждый из которых независимо инфицировал человека. К группе O (*outlier*, т.е. "посторонних", "отдельных", "отдаленных") входят штаммы ВИЧ-1, которые дивергентно отдалены от основной массы филогенетично родственных штаммов из группы M (*major group*, основной группы), к которой отнесено на сегодня 10 субтипов (генотипов/серотипов A-J). Полный молекулярно-эпидемиологический и серологический анализ позволяет установить, насколько широко представлены данные гено- и серотипы в определенных районах; во многих случаях четко выявлены географические кластеры (сосредоточение) определенных серотипов. Например, до 1993 г. все исследованные изоляты Северной Америки и Европы принадлежали к серотипу B, который обнаружили также и в Бразилии, Таиланде, Египте и Уганде. В ряде стран Восточной Европы выявлены изоляты субтипов F, G, H и I, а в США - до недавнего времени неизвестные изоляты субтипов A, D и E; есть подобные данные относительно ряда западноевропейских стран, где преобладает субтип A. По нашим данным, в Украине сегодня распространены, главным образом, субтипы A и C. Кроме того, изоляты субтипа C обнаруживают преимущественно на юге и на востоке Африки и на западном побережье Индии, что совпадает с данными о сходстве штаммов с востока Африки и индийских штаммов [15,16].

Некоторые имеющие литературные данные свидетельствуют об определенной взаимосвязи между характером развития вирусной инфекции ("мерой ее злокачественности") и серотипом ВИЧ-1. Установлена корреляция между фенотипом ВИЧ-1 (а вирулентность вируса есть одним из маркеров его фенотипа) и

молекулярной структурой третьего варибельного домена (петли V3, или так называемой V3-loop) [15,16]. Например, показано, что при заражении вирусом серотипов С, D или G болезнь прогрессирует значительно медленнее, чем при инфицировании вирусом, который принадлежит к серотипам А или Е. Существует мысль о связи серотипа со способностью ВИЧ-1 распознавать определенные рецепторы на определенных типах клеток в инфицированном организме. Вирусные штаммы, которые не вызывают возникновения синцитиев, менее активны, менее заразны, чем штаммы, которые приводят к слиянию инфицированных клеток. Появление вирусных изолятов, вызывающих образование синцитиев после инфицирования субтипом В, свидетельствует о том, что болезнь подошла к конечной стадии. При заражении ВИЧ-1 субтипа Е выявлено появление синцитиев на ранней, еще доклинической стадии инфекции. Для субтипа С не описаны варианты, которые вызывают возникновение синцитиев. Однако некоторые авторитетные клиницисты возражают о наличии очевидной, хорошо заметной взаимосвязи между серотипом вируса, которым инфицирован больной, и клиническими проявлениями болезни, хотя есть указания на существование дефектных штаммов, которые будто бы не вызывают развития болезни [9].

Клиническая стадия инфекции полностью проявляется с того момента, когда начинается беспрерывная и ускоренная потеря Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup>. Такую потерю считают одним из ведущих факторов возникновения СПИДа после ВИЧ-инфицирования. Исследования естественного протекания ВИЧ-инфекции у человека выявили очень широкий диапазон ее клинических проявлений – от скрытых, бессимптомных стадий к заболеванию, которое однозначно угрожает здоровью и жизни больного и характеризуется чрезвычайно низким содержанием Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup>, тяжелым иммунодефицитом и, как следствие – развитием многочисленных и разнообразных оппортунистических инфекций и злокачественных образований [3,9,10,11].

Следует отметить, что все настоящие классификации ВИЧ-инфекции/СПИДа нуждаются в дальнейшем развитии в связи с некоторыми успехами антиретровирусной терапии. Дополнением к русской классификации могло бы стать определение характера той

понято также, что одним из основных источников мимикрии являются «странствующие» генетические структуры как переносчики генетической информации между соматическими клетками; речь идет именно о передаче генетической информации, не связанной с процессом размножения. От таких структур возникли вирусы, несущие часть информации, закодированной в геноме хозяина. Со временем многие вирусы, приобретаая способность проникать в другие, инородные клетки, изменились, частично сохранив генетическую родственность с клетками, от которых достаточное далеко отошли, и с другими родственными вирусами. Кроме того, мимикрия может возникнуть:

- благодаря горизонтальной передаче генетической информации (например, через вирусы, плазмиды или в ходе так называемой генетической трансформации у бактерий);

- при интеграции чужой генетической информации в геном, клетка получает способность синтезировать новые белки, которые, возможно, будут иметь антигенную (и другую) похожесть с белками очень и очень отдаленных видов.

Как известно, геномы современных многоклеточных организмов содержат многочисленные ретровирусные последовательности, причастные к функционированию хозяйского генома. Очевидно, определенные области этих последовательностей в геноме человека могут напоминать короткие или длинные участки в геномах ретровирусов, патогенных для человека. Такая мысль подтверждается тем, что приблизительно 5 % моноклональных антител против 15 очищенных препаратов разных вирусов реагируют также с хозяйскими антигенными детерминантами [33]. В этих опытах проанализировали свыше 800 МКА против таких общеизвестных представителей ДНК- и РНК-содержащих вирусов, как вирус простого герпеса, цитомегаловирус, вирус Епштейна-Барр, вирус вакцины, миксовирусы, парамиксовирусы, аренавирусы, флавивирусы, ортовирусы, рабдовирусы, коронавирусы и ретровирусы человека [34]. Эти результаты дали основание для гипотезы о том, что молекулы, кодированные неподобными генами, белковые продукты разных генов имеют некоторые подобные структурные

- Продолжительность анализа 2,5 часа.
- Один набор рассчитан на 192 анализов.
- Разные варианты комплектации наборов по выбору потребителя: стриповый или монолитный планшет, хромоген ТМБ или ОФД.
- Срок годности 12 месяцев

### **Обсуждение результатов ИФА**

Современные методы лабораторной диагностики позволяют достаточно надежно обнаруживать антигены к ВИЧ, его антигены, идентифицировать компоненты вируса, определять вирусную нагрузку, и т.п. Однако высокая изменчивость ВИЧ, не имеющая аналогов по сравнению с изменчивостью других известных вирусов человека, создает некоторый риск получения ложноположительных результатов исследования [30]. Эту проблему удается решить благодаря использованию в тест-системах рекомбинантных белков, созданных из консервативных участков вируса.

Следует, тем не менее, заметить, что все тест-системы компании «Диапроф-Мед», как и большинство подобных современных систем импортного производства, предназначены для определения антигел против ВИЧ, показали 100 %-ю чувствительность при работе со стандартными контрольными образцами. Сложнее обстоит дело относительно специфичности определения антигел против ВИЧ и получаемых ложноположительных результатов (ЛПР) исследований [31].

По сводным данным ВОЗ, при использовании наилучших диагностикумов для выявления ВИЧ-инфекции частота ЛПР составляет 0,0004-0,0007 % [32].

Одной из причин появления ЛПР может быть так называемая антигенная мимикрия. Под антигенной мимикрией понимают случаи наличия у белков разного происхождения или подобной, или целиком тождественной первичной аминокислотной последовательности и структуры. Такая тождественность бывает следствием общего происхождения двух или многих структур определенных функционального назначения; некоторые из них сохранили разительное сходство у очень отдаленных видов. Сейчас

или другой стадии болезни. В каждой стадии можно выделить фазу нарастания (прогрессирования) болезни и фазу ремиссии. Фаза прогрессирования характеризуется наличием клинических проявлений болезни, а фаза ремиссии - отсутствием или ослаблением этих проявлений. Необходимо также охарактеризовать в классификации те случаи, когда в результате успешного лечения наступает продолжительное улучшение состояния больного. Ныне комбинированная антиретровирусная терапия, проводимая на стадии ЗБ, может на довольно длительное время привести больного к состоянию бессимптомной инфекции. Поэтому В.В.Покровский с соавторами считают, что в классификацию следует внести также понятие о спонтанной и терапевтической ремиссии. Кроме того, они не признают целесообразности некоторых положений Центра контроля заболеваемости США (Centers for Disease Control - CDC, Атланта) относительно классификации ВИЧ-инфекции, хотя утверждают, что современная американская классификация клинических стадий ВИЧ/СПИД очень приближается к русской.

Высказана также мысль, что для определения стадии ВИЧ-инфекции следует использовать данные о вирусной нагрузке - о наличии вирусной РНК в 1 мл плазмы крови инфицированного человека; этот показатель определяется при помощи полимеразной цепной реакции. Вирусная нагрузка может достигать от нескольких копий до  $10^6$ - $10^7$  копий в 1 мл плазмы. Это один из важнейших показателей развития ВИЧ-инфекции и результативности лечения, поскольку определение именно этого показателя дает возможность непосредственно оценить состояние размножения ВИЧ в инфицированном организме в данный момент [11].

Конечно же, патогенез ВИЧ-инфекции обусловлен особенностями штамма ВИЧ, который вызвал инфицирование, его изменчивостью в организме и иммунным ответом хозяина на инфекцию. Разный вклад этих ключевых факторов определяет конечный результат ВИЧ-инфекции - долгодействующее выживание зараженного организма или ускоренное развитие СПИДа со всеми сопутствующими явлениями [9]. Не всегда удается, как того требуют методологические подходы классической патологии, "отличить в картине заболевания то, что есть в ней результатом повреждения, а что становится результатом

противодействия организма в ответ на это повреждение. Эти две категории явлений часто путаются, переплетаются между собой". Такое замечание особенно касается тех стадий ВИЧ-инфекции, когда к ней через ослабление организма присоединяются другие возбудители инфекционных болезней.

ВИЧ-инфекция характеризуется многолетним развитием, и до недавнего времени считали, что она всегда заканчивается только смертью. Однако сообщения о маловирулентных и дефектных штаммах ВИЧ и описание затяжных "дряблых" длительно текущих процессов у некоторых ВИЧ-инфицированных с определенными генетическими маркерами свидетельствует о возможности благоприятного завершения инфекционного процесса. Вместе с тем описаны случаи смерти от СПИДа уже через семь месяцев после инфицирования. Раньше случаи быстрого прогрессирования болезни связывали именно с изолятами вируса, которые характеризуются ускоренным размножением в культуре. Тем не менее, В.В.Покровский и соавт., проанализировав имеющиеся сведения по этому вопросу, показали, что такая корреляция проявляется не всегда и что "от больных из одной эпидемической цепи, зараженных генетически однородным вирусом, можно выделить изоляты, отличающиеся по исследуемым маркерам". Вообще считают, что после заражения человека на развитие болезни, на ее патогенез влияет еще много разнообразных факторов; патогенез отнюдь не обусловлен самим штаммом ВИЧ, который вызвал инфекцию, и вирулентностью данного штамма; постоянную детерминанту развития патологического процесса представляют лишь генетические особенности инфицированных. Большое влияние на течение ВИЧ-инфекции имеют другие сопутствующие патогены (вирусы группы герпеса, папавирусы и другие возбудители со свойствами суперантигенов), а также инородные антигены и цитокины, усиливающие иммунную активацию (и, отсюда, способность ВИЧ размножаться в клетках хозяина). Дополнительное угнетение иммунной системы из-за неблагоприятного влияния других инфекций, терапевтических препаратов и токсинов тоже вносит весомый вклад в развитие болезни [9,11].

Вообще изучение патогенеза ВИЧ-инфекции на клеточном уровне и на уровне целого организма уже дало определенные

p24 HIV1<sub>пв</sub> (Advanced Biotechnologies, США) составила 70 пг/мл. Кроме панелей сывороток для детальной оценки чувствительности тест-системы на сыворотках крови ВИЧ-инфицированных граждан Украины было протестировано 80 образцов крови ВИЧ-инфицированных лиц на стадии ранней сероконверсии, данные сыворотки были предоставлены лабораторией вирусных гепатитов и ВИЧ-инфекции Института эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л. В. Громашевского АМН Украины. Все исследованные образцы в тест-системе "DIA-HIV-Ag/Ab" были выявлены как положительные.

### Специфичность

При оценке специфичности тест-системы на стандартной панели сывороток, не содержащих антител к ВИЧ (МБС, Россия) ложноположительных результатов не выявлено. Из 412 образцов сывороток крови доноров и 220 сывороток крови беременных женщин показатель специфичности составил 99,5 %.

### Особенности и преимущества тест-системы

- Высокая чувствительность и специфичность.
- Использование высокоочищенных и высокоспецифичных моноклональных антител против антигена p24 ВИЧ и рекомбинантных белков-аналогов оболочечных антигенов ВИЧ-1 и ВИЧ-2 - env1 (gp120, gp41) и env2 (gp36) в составе иммуносорбента.
- Использование в качестве конъюгатов антигенов env1 и env2, меченных пероксидазой, а также поликлональных аффинноочищенных биотинилированных антител к белку p24 и стрептавидинау, меченного пероксидазой.
- Одновременная инкубация сывороток с конъюгатами антигенов Env1 и Env2 и биотинилированных антител к белку p24 в лунках планшета.
- Открытая система, легко адаптируемая к условиям рутинного серологического тестирования.
- Общепринятая стандартизация учета результатов.

положительные результаты с точки зрения клиницистов. Понимание механизмов репродукции вируса и его взаимодействия с клетками дало возможность использовать в терапии ВИЧ-инфекции соединения, которые тормозят активность обратной транскриптазы, транскрипцию РНК с провирусной ДНК и синтез вирусных белков.

### **Чувствительность**

На современном этапе для скрининговых исследований ВИЧ-инфекции наиболее широко применяются тест-системы третьего поколения, позволяющие обнаруживать анти-ВИЧ специфические антитела на 28-й день с момента инфицирования. Однако этот период может быть сокращен на 4-8 дней при использовании наборов четвертой генерации, которые предназначены для одновременного выявления антител, специфичных к ВИЧ и корового антигена ВИЧ - p24. Применение тест-систем такого типа в службе переливания крови безусловно существенно повышает безопасность донорской крови в отношении ВИЧ

Показатели информативности тест-системы четвертого поколения «DIA-HIV-Ag/Ab» оценивали на стандартных и коммерческих панелях, а также на образцах сывороток крови доноров и беременных. Во время тестирования на стандартных панелях сывороток, содержащих антитела к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 (МБС, Россия); панели сывороток, содержащих антитела к ВИЧ-1 в низких титрах PRB-107 (ВВ1, США); панели сывороток, содержащих антиген p24 в разных титрах PRA203 (ВВ1, США) чувствительность тест-системы составила 100 %. Способность тест-набора «DIA-HIV-Ag/Ab» обнаруживать ВИЧ-инфекцию на ранних сроках инфицирования определяли на сероконверсионных панелях PRB 912, PRB927, PRB928 (ВВ1, США). В этих исследованиях все образцы панели PRB 912 были положительными. На панелях PRB927 и PRB928 не были выявлены положительными лишь первые сыворотки, в которых, согласно паспортным данным, отсутствуют специфические антитела, антиген p24 и РНК-ВИЧ. Остальные сыворотки в составе панелей (№ 2-5 PRB927, № 2-5 PRB928) были выявлены как положительные, при чем со значением оптической плотности > 2,0 (предельное значение в системе 0,205 оптических единиц). Граница чувствительности тест-набора относительно выявления p24 при использовании очищенного нативного антигена

### **Характеристика показателей качества тест-системы «DIA-HIV-Ag/Ab»**

#### **Современные методы лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции**

Развитие лабораторных методов для выявления ВИЧ-инфекции началось тогда, когда были уже достигнуты выдающиеся успехи в иммуноферментной диагностике вирусных и других заболеваний. Иммуноферментный анализ (ИФА) сразу же занял видное место при диагностировании ВИЧ-инфекции. В данном пособии речь пойдет конкретно о применении ИФА для выявления антигенов ВИЧ и антител против них. [17].

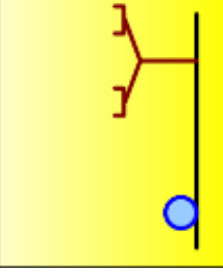
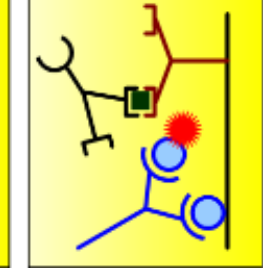

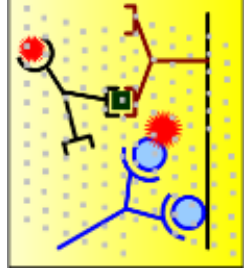
Материалами для серологических исследований могут быть: сыворотка (плазма) крови, слюна, слезная жидкость, спинномозговая жидкость, моча, генитальные секреты, т.е. все биологические жидкости организма, но самый удобный материал для диагностики - это сыворотка (плазма) крови.

ИФА ныне стал наиболее распространенным методом диагностики ВИЧ благодаря ряду его бесспорных преимуществ. К ним относят высокую чувствительность, возможность использования минимальных объемов исследуемых образцов биологических жидкостей, простоту проведения реакции, инструментальный учет полученных результатов и автоматизацию почти всех этапов ИФА и, не в последнюю очередь, относительно низкую стоимость диагностических наборов. Следует отметить, что хотя существует несколько вариантов ИФА (прямой, конкурентный, "сандвич"), во всех используют конъюгат фермента со специфическими антителами/антигенами и проявитель (смесь субстрата с хромогеном), в результате ферментативной реакции развивается окраска реакционной смеси [17,18].

Большинство тест-систем на основе ИФА для выявления суммарных антител к ВИЧ создано по принципу классического твердофазного ИФА (ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Как твердую фазу (иммуносорбент) чаще применяют полистирол с иммобилизованными на его поверхности антигенами - аналогами диагностически важных (иммунодоминантных) белков ВИЧ. Конъюгат, применяемый в ИФА при тестировании ВИЧ-инфекции, – это антитела к иммуноглобулинам человека (антивидовые антитела), синтетические или рекомбинантные пептиды, меченные ферментом (например, пероксидазой хрена или щелочной фосфатазой). Индикатором для выявления комплекса антиген-антитело служит раствор проявителя, который содержит субстрат и хромоген (например, *o*-фенилендиамин – ОФД или тетраметилбензидин – ТМБ при работе с пероксидазой хрена). Интенсивность окраски реакционной смеси, которую определяют фотометрически (по величине оптической плотности - ОП), линейно зависит от наличия и концентрации антител к ВИЧ в исследуемом образце сыворотки (плазмы) крови [17,18].

Ранние антитела к основным внутренним белкам ВИЧ - р55, р24, р17 (все это продукты гена gag) - можно определять с помощью ИФА приблизительно у 75 % лиц в среднем на 6-ой неделе инфицирования. Наиболее иммуногенными (иммунодоминантными) считаются гликопротеины - продукты гена env (gp160, gp120 и gp41), антитела к которым, как правило, появляются позднее и выявляются у 98 % инфицированных лиц. Для ВИЧ-инфекции характерно наличие так называемого периода "сероконверсионного окна" (его еще называют серонегативным, латентным, инфекционным, диагностическим окном), когда антител к ВИЧ в сыворотке крови еще нет или же количество их настолько незначительно, что они не выявляются современными иммуноферментными тест-системами для определения антител. Как правило, первыми появляются иммуноглобулины класса М к белкам, кодированным геном gag; они циркулируют во время виремии. Через 5-7 дней после появления антител класса IgM начинают синтезироваться антитела класса IgG к р24 и gp120. Установлено, что у более чем 95 % ВИЧ-инфицированных лиц сероконверсия происходит на протяжении 5-6 месяцев после

### Схема 3. Проведение ИФА на тест-системе "DIA-HIV-Ag/Ab" Этапы проведения анализа

Процедура	Формирование комплекса
Поли стироловые стриппы, сенсбилизированы рекомбинантными белками и моноклональными антителами к р24	
Внесение в лунки по 100 мкл образцов контролей и сывороток и по 50 мкл антител детекции с биотином, а также рекомбинантных белков, меченных ПХ. Инкубация 60 мин при 37 °С (формирование комплексов МКА-р 24-МКА+биотин и АГ-АТ-АГ+ПХ).	
Промывание 6 раз буфером. Внесение раствора стрептавидаина +ПХ. Инкубация 30 мин. Присоединение стрептавидаина к биотину.	
Внесение в лунки по 100 мкл раствора проявителя. Инкубация 30 мин. при комнатной температуре (окраска). Остановка реакции стоп-реагентом. Регистрация оптической плотности.	



### Принцип анализа

Основные компоненты набора “DIA-HIV-Ag/Ab” - иммуносорбент с сорбированными на нем моноклональными антителами против белка p24 и рекомбинантными антигенами env-1 и env-2.

Конъюгат № 1 - смесь кроличьих поликлональных аффинноочищенных биотинилированных антител против белка p24 и очищенные рекомбинантные белки env ВИЧ-1 и env ВИЧ-2, меченные пероксидазой (ПХ).

Конъюгат № 2 - стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой.

Во время проведения иммуноферментного анализа, исследуемые сыворотки инкубируют одновременно с пероксидазными конъюгатами рекомбинантных антигенов и биотинилированными антителами против белка p24, на втором этапе инкубацию проводят с конъюгатом стрептавидина, меченного пероксидазой. После соединения антител с антигенами и образования комплексов, их обнаруживают с помощью проявителя, который в результате ферментной реакции с субстратом и хромогеном окрашивает реакционную смесь.

В качестве проявителя используют субстрат - перекись водорода и хромоген - тетраметилбензидин. Пероксидазную реакцию останавливают, прибавляя стоп-реагент и измеряют оптическую плотность при 450/620 нм. На схеме 3 показана поэтапная последовательность проведения иммуноферментной реакции на тест-системе „DIA-HIV-Ag/Ab”.

заражения ВИЧ, а продолжительность этого периода зависит от инфекционной дозы, пути передачи вируса, некоторых других факторов [19-22].

Короткая, но насыщенная история разработки диагностикумов для выявления антител к ВИЧ представлена несколькими поколениями тест-систем, при этом совершенствовались используемые реактивы, антигены и конъюгаты, были стандартизированы и автоматизированы условия проведения реакций; теперь можно полнее и четче понимать клиническое значение полученных результатов.

В диагностикумах первого поколения как антиген использовали инаktivированные, а в дальнейшем - разрушенные и очищенные лизаты культурального вируса. При использовании этих наборов получали относительно высокий уровень неспецифических результатов, как ложноотрицательных, так и ложноположительных. С одной стороны, усиленная сорбция отдельных вирусных белков на пластике обуславливала достаточно высокую чувствительность "лизатных" диагностикумов. Но вместе с тем, приотглавление лизата ВИЧ-инфицированных клеток - процесс опасный, сложный и стоит дорого; процедуру очищения ВИЧ от балластных веществ тяжело стандартизировать и технологизировать. Это влияло на специфические свойства белков ВИЧ, что приводило к получению определенного количества ложноотрицательных результатов. Кроме того, недостаточная чистота естественного вирусного антигена создавала условия для получения ложноположительных реакций. С помощью тест-систем 1-го поколения можно обнаруживать антитела к ВИЧ в среднем начиная лишь с 55 дня после инфицирования. Именно с этих диагностикумов началось развитие серологической диагностики ВИЧ-инфекции; они стали начальным инструментом при обследовании разных групп лиц, прежде всего, при обследовании доноров крови.

Некоторые недостатки диагностикумов первого поколения устранили в иммуноферментных наборах 2-го поколения, где антигенами служили рекомбинантные и синтетические полипептиды-аналоги вирусных белков. Применение тест-систем 2-го поколения позволило обнаруживать антитела к ВИЧ, начиная

уже с 42-го дня после инфицирования. Однако эти тесты (конъюгатом в которых были антивидовые антитела против человеческих иммуноглобулинов класса G или белок A St. aureus) не определяли антител класса IgM, которые первыми синтезируются в зараженном организме, а потому и не давали возможности выявлять антитела к ВИЧ у лиц на ранней стадии инфицирования. Попытка решить проблему, создав тест-системы лишь для определения антител класса IgM оказалась неудачной: на начальной стадии ВИЧ-инфекции уровень IgM тоже довольно незначительный. Создание принципиально новых конъюгатов (на основе рекомбинантных и/или синтетических пептидов, меченных ферментом) разрешает обнаруживать как IgG, так и IgM, а также IgA; такой замысел успешно воплотился в тест-системах 3-го поколения, применение которых дало возможность сократить период "окна" в среднем до 20 дней. Кроме того, в диагностикумах 3-го поколения на твердой фазе, как правило, засорбированы антигены с детерминантами, специфичными не только для ВИЧ-2 и для основных субтипов ВИЧ-1, но и для менее распространенного субтипа О ВИЧ-1. На сегодня именно иммуноферментные тест-системы 3-го поколения чаще применяются в диагностической практике [23].

Следующим успехом в разработке тест-систем на основе ИФА было создание так называемых комбинированных тестов - диагностикумов 4-го поколения, предназначенных для одновременного выявления и антител к ВИЧ, и вирусного антигена р24 ВИЧ-1. По данным фирм-производителей, такие диагностикумы дают возможность обнаруживать маркеры инфицирования ВИЧ на 4-8 дней раньше, чем при использовании наборов 3-го поколения, а при высокой концентрации антигена р24 в пробе сыворотки крови тесты 4-го поколения сокращают период "окна" в среднем на 2 недели [23,24]. Следует, однако, указать, что при применении комбинированных тестов положительные результаты первичного исследования нуждаются в дополнительной верификации на антиген р24; это усложняет процесс проверки и требует больших затрат [23].

"Золотым стандартом", подтверждающим специфичность полученного положительного результата при тестировании ВИЧ

## DIA-HIV-Ag/Ab

### тест-система иммуноферментная

#### IV поколение для одновременного определения антител специфичных к ВИЧ ½ и корового антигена ВИЧ (p24)

"DIA-HIV-Ag/Ab" - тест-набор предназначен для скрининговых и подтверждающих исследований сыворотки и плазмы крови человека на наличие корового антигена вируса иммунодефицита человека (p24) и суммарных антител (IgG, IgM, IgA) к ВИЧ ½ методом твердофазного иммуноферментного анализа. "DIA-HIV-Ag/Ab" - диагностикум новой генерации для раннего выявления ВИЧ-инфекции на основе рекомбинантных белков и моноклональных антител; одновременно в одном анализе можно обнаруживать как антигены ВИЧ, так и антитела против него, что улучшит диагностику за счет уменьшения "сероконверсионного окна".

Характерной особенностью тест-системы является использование рекомбинантных белков-аналогов оболочечных антигенов ВИЧ-1 и ВИЧ-2 - env1 (gp120, gp41) и env2 (gp36), соответственно. Для выявления корового антигена ВИЧ - p24 используются моноклональные антитела к p24 (в составе иммуносорбента) и биотинилированные поликлональные аффинноочищенные антитела к рекомбинантному антигену p24 (антитела детекции).

Для определения антигена p24 применен метод молекулярного усиления на основе биотин-стрептавидинового взаимодействия, наряду с биотинилированными антителами используются пероксидазный конъюгат стрептавидина. Анти-ВИЧ специфические антитела обнаруживают по принципу "сандвич"-варианта ИФА, где Fab-фрагменты анти-ВИЧ специфических антител связываются как с рекомбинантными антигенами на твердой фазе, так и с антигенами в составе иммуноферментного конъюгата.

серия 009 производства Медико-биологического Союза (МБС, Россия). В состав панели входят 20 образцов лиофилизированных сывороток.

- 50 образцов сывороток крови доноров, которые не содержат антител к ВИЧ.

Установлено, что специфичность данной тест-системы на примененной панели сывороток и образцах донорской крови составляла 100 %.

#### **Особенности и преимущества тест-системы**

- Высокая чувствительность и специфичность.
- Использование высокоочищенных и высокоспецифичных моноклональных антител против антигена р24 ВИЧ в составе иммуносорбента.

• Использование в качестве конъюгатов поликлональных аффинноочищенных биотинилированных антител к белку р24 и стрептавидина, меченного пероксидазой.

• Одновременная инкубация сывороток и конъюгата № 1 в лунках планшета.

• Визуальный контроль внесения конъюгата к образцам сыворотки или плазмы крови в лунки планшета за счет изменения цвета раствора.

• Открытая система, легко адаптируемая к условиям рутинного серологического тестирования.

- Общепринятая стандартизация учета результатов.
- Продолжительность анализа 2,5 часа.
- Один набор рассчитан на 192 анализа.
- Разные варианты комплектации наборов по выбору потребителя: стриповый или монолитный планшет, хромоген ТМБ или ОФД.
- Срок годности 12 месяцев.

методом ИФА, сегодня остается иммунный блоттинг (иммуноблот - ИБ, или Western blot - WB). В полиакриламидном геле при электрофореze происходит распределение предварительно очищенных антигенов ВИЧ по молекулярной массе; потом их переносят на нитроцеллюлозную мембрану, разрезанную на полоски. Исследуемый материал (сыворотку или плазму крови пациента) наносят на полоски и, в случае наличия в пробе специфических антител, эти антитела связываются с соответствующими (комплементарными к ним) антигенам. Результат такого взаимодействия визуализируют путем последовательного добавления конъюгата, меченного ферментом, и проявителя. Интерпретацию результатов исследований осуществляют соответственно инструкции для конкретной тест-системы [25].

Наряду с диагностикой, базирующимися на классическом ИБ, существуют и так называемые "линейные" тесты, которые также применяются для подтверждения первично положительных результатов ИФА. Эти тесты отличаются от классических наборов тем, что здесь используют рекомбинантные или синтетические пептидные антигены, нанесенные на нитроцеллюлозные полоски. Считается, что линейным тестам присуща более высокая специфичность по сравнению с классическим вариантом ИБ, поскольку здесь отсутствуют компоненты клеток, способные перекрестно реагировать с компонентами исследуемых образцов сывороток [25].

Проведение исследований на наличие антител к ВИЧ с помощью ИФА и ИБ предусматривает хорошее оснащение диагностических лабораторий, укомплектованных всем необходимым оборудованием. Но довольно часто проведение таких исследований затруднено или невозможно, особенно в небольших периферийных больницах или лабораториях. В этих случаях для срочного обследования донорской крови, для обследования небольшого количества пациентов (прежде всего в неотложных случаях, а также для частных лиц с целью установления заражения ВИЧ) целесообразно использовать так называемые быстрые/простые тесты [26].

Быстрые/простые тесты для выявления антител к ВИЧ - это диагностические наборы (тест-системы), применение которых разрешает получить результат без использования специального оборудования для проведения ИФА. Как материал для исследования можно использовать образцы нефракционированной крови, сыворотку или плазму крови. Разработаны и применяются также быстрые тесты для определения антител к ВИЧ в образцах слюны и мочи.

Большинство быстрых тестов дает возможность дифференцированно обнаруживать антитела к ВИЧ-1 и ВИЧ-2. В самих тестах предусмотрено образование контрольного пятнышка или полосы, которая позволяет проверять корректность проведенного анализа. Следует отметить, что хотя применение быстрых тестов не нуждается в специальном оборудовании для проведения анализа, стоимость одного исследования выше, чем при использовании традиционного ИФА. Кроме того, полученные результаты тестирования оцениваются визуально, т.е. истолковываются субъективно; при этом не остается документально подтвержденного результата анализа. Учитывая это обстоятельство, при использовании быстрых тестов чрезвычайно важно убедиться в высоком уровне профессиональной подготовки персонала, который осуществляет исследование.

Непосредственное определение вируса для диагностики ВИЧ-инфекции на практике используют значительно реже, чем выявление антител к ВИЧ, антигенов возбудителя или его генетического материала; это обусловлено рядом причин. В основе вирусологических методов выявления ВИЧ лежит культивирование лимфоцитов, полученных от больного или вирусоносителя, со стимулированными лимфоцитами от неинфицированных лиц или с чувствительными клеточными линиями. В культурах периодически определяют наличие обратной транскриптазы ВИЧ и/или вирусного антигена. Тем не менее выделить и идентифицировать вирус удается не всегда. Это связано как со временным непродолжительным характером виремии, так и с непостоянством высвобождения вируса из клетки [27].

### Характеристика показателей качества тест-системы «DIA-HIV-p24»

#### **Чувствительность**

Определение чувствительности тест-системы „DIA-HIV-p24” проводили, используя:

- стандартную панель охарактеризованных сывороток, которые содержат антиген p24 в разных концентрациях „HIV-p24 Antigen Mixed Titer Performance Panel”, производства BBI (Boston Biomedica Inc., США) - PRA901. В состав панели входят 18 образцов сывороток и плазмы, содержащие коровый антиген ВИЧ - p24 в разных концентрациях (16 из них содержат еще и антитела), а также один образец отрицательной сыворотки и один образец отрицательной плазмы в качестве отрицательных контролей.

- нативный коровый антиген p24 HIV<sub>1</sub><sup>пнв</sup> Purified Native Protein производства Advanced Biotechnologies (США).

Из 18 образцов сывороток, содержащих антиген p24 в разных концентрациях, все были выявлены положительными, оба отрицательных образца этой панели были отрицательными. Чувствительность тест-системы при проверке на стандартной панели составляла 100 %.

Согласно Аналитической нормативной документации (АНД) тест-система „DIA-HIV-p24” должна достоверно определять 20 пг/мл и выше корового антигена ВИЧ (p24) при проверке ее с использованием очищенного нативного антигена p24 „HIV<sub>1</sub><sup>пнв</sup> Purified Native Protein”. Для оценки чувствительности этот нативный антиген двукратно титровали, начиная с концентрации от 640, 320, 160, 80, 40 до 20 пкг/мл. Установлено, что чувствительность тест-системы «DIA-HIV-p24» относительно выявления антигена p24 составляла 20 пикограмм на миллилитр.

#### **Специфичность**

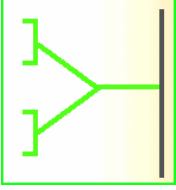
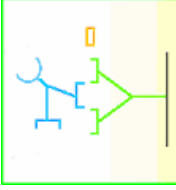
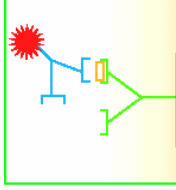
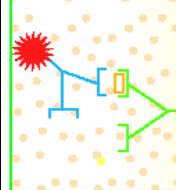
Специфичность тест-системы „DIA-HIV-p24” проверяли, используя:

- стандартную панель сывороток, которые не содержат антитела к вирусу иммунодефицита человека ОСО 42 28-214-94

пероксидазы (перекись водорода) и хромоген - (ТМБ). Пероксидазную реакцию останавливают, прибавляя стоп-реагент, и измеряют оптическую плотность (ОП) смеси в лунках, которая при длине волны 450 нм пропорциональна концентрации p24 в образцах сывороток или плазмы крови.

**Схема 2 Проведение ИФА на тест-системе “DIA-HIV-p24”**

Этапы анализа

Процедура	Формирование комплекса
Полистироловые стрипы, сенсibilизированы моноклональными антителами к p24	
Внесение в лунки по 100 мкл образцов контролей и сывороток и по 50 мкл раствора конъюгата № 1. Инкубация 60 мин при 37 °С (формирование комплекса МКА-р 24-АГ+ биотин).	
Промывание 6 раз буферным раствором. Внесение в лунки раствора конъюгата № 2. Инкубация 30 мин. Присоединение стрептавидина, меченного ПХ к биотину.	
Внесение в лунки по 100 мкл раствора проявителя (перекиси водорода и хромогена). Инкубация 30 мин. при комнатной температуре (окраска). Остановка реакции стоп-реагентом. Регистрация оптической плотности.	

Исследованиями доказан двухволновой характер антигенемии при ВИЧ-инфекции. Первичную временную антигенемию наблюдают через 1-3 недели после заражения. Антигеном, который свободно циркулирует в крови на этой стадии, является белок p24, так как на ранних стадиях инфекции он слабо связывается специфическими антителами, которых еще в организме мало. При нарастании титров антител против ВИЧ первичная антигенемия прекращается. Тем не менее, установлено, что, несмотря на исчезновение вируса из кровотока, беспрерывное его размножение происходит в лимфоидных тканях. Повторная антигенемия проявляется уже позднее - это плохой прогностический признак, который свидетельствует о развитии СПИДа. Считают, что антигены ВИЧ исчезают после связывания их со специфическими антителами и затем появляются снова из-за снижения титров антител при угнетении иммунной системы [28,29].

Для ранней диагностики ВИЧ-инфекции стало общепризнанным методическим приемом выявление антигенов ВИЧ (прежде всего, вирусного белка p24) методом ИФА. Однако известно, что свободный p24, не связанный с антителами, циркулирует в крови инфицированного лица лишь в начале болезни и в терминальной стадии; поэтому применение тест-систем на основе выявления p24 в повседневной лабораторной диагностике ВИЧ-инфекции до недавнего времени было ограничено. В последнее время появилось ряд сообщений об усовершенствовании методик иммуноферментного выявления антигена p24, приведшее к повышению чувствительности анализа [23].

В ряде случаев (диагностика инфекции в серонегативном периоде, у детей, родившихся от ВИЧ-положительных матерей, и т.п.) эффективность определения ВИЧ-инфекции с помощью стандартных методов, прежде всего путем выявления антител, недостаточна. Внедрение в лабораторную практику молекулярно-биологических методов исследований, в первую очередь, метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), открыло новые перспективы в диагностике ВИЧ-инфекции. С помощью ПЦР можно выявить РНК или ДНК ВИЧ, даже при полном отсутствии или минимальном количестве антител в крови, когда их не удается

обнаруживать серологическими методами. Поскольку после заражения РНК ВИЧ удаётся определять в среднем на 11 дней раньше, чем антигена к возбудителю, предложено применять ПЦР как наиболее эффективный путь сужения "сероконверсионного окна" при тестировании донорской крови на ВИЧ [29].

Как материал для исследования методом ПЦР можно использовать препараты, выделенные не только из свежих биосубстратов, но и из замороженных, высушенных или фиксированных образцов, которые содержат нуклеотидные последовательности частично разрушенных нуклеиновых кислот. ПЦР расширяет возможности диагностики ВИЧ-инфекции благодаря способности обнаруживать инфицирование на ранних его этапах, определять концентрацию вируса, экспрессию его генов, контролировать эффективность лечения, прогнозировать ход ВИЧ-инфекции и т.п. Методом ПЦР можно обнаруживать ВИЧ в крови как в виде провирусной ДНК, интегрированной в геном моноклеарных клеток периферической крови, так и в виде вирионной РНК. На сегодня определение провирусной ДНК методом ПЦР применяют именно для диагностики ВИЧ-инфекции, а определение вирионной РНК ВИЧ - для определения концентрации вируса (вирусной нагрузки) в крови с целью прогноза течения болезни, проверки действенности противовирусной терапии и т.п.

Научно-производственная компания „Диапроф-Мед” разработала и выпускает три тест-системы для иммуноферментной диагностики ВИЧ-инфекции:

DIA-HIV1/2 - тест-система иммуноферментная III поколения для выявления специфических антигел к ВИЧ ½.

DIA-HIV-p24 - тест-система иммуноферментная для количественного определения корового антигена ВИЧ I (p24).

DIA-HIV-Ag/Ab - тест-система иммуноферментная IV поколения для одновременного определения антигел, специфических к ВИЧ ½ и корового антигена ВИЧ-I (p24).

## **DIA-HIV-p24** тест-система иммуноферментная для количественного определения корового антигена ВИЧ I (p24)

Тест-система DIA-HIV-p24 предназначена для исследования сыворотки и плазмы крови человека на наличие корового антигена p24 вируса иммунодефицита человека первого типа. Для определения антигена p24 был применен метод молекулярного усиления на основе биотин-стрептавидинового взаимодействия, наряду с биотинилированными антигенами использовали пероксидазный конъюгат стрептавидина.

Набор включает следующие компоненты: иммуносорбент - полистироловый планшет, лунки которого сенсibiliзированы моноклональными антигенами к p24 ВИЧ-I; конъюгат № 1 - кроличьи поликлональные аффиноочищенные биотинилированные антигена к белку p24 и конъюгат № 2 - стрептавидин, конъюгированный с ферментом пероксидазой, в стабилизированном растворе; положительный контроль - инактивированная сыворотка крови человека, содержащая коровый антиген p24 ВИЧ-I с известной концентрацией; отрицательный контроль - сыворотка крови человека, не содержащая коровый антиген p24, поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) и антигена к ВИЧ, вирусу гепатита С, возбудителю сифилиса *Treponema pallidum*; хромоген ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин); концентрат фосфатного буфера для промывания планшетов; раствор для разведения конъюгата; раствор для приготовления проявителя и стоп-реагент.

При внесении в лунки планшета образцов сывороток инфицированной крови и поликлональных аффиноочищенных биотинилированных антигел к белку p24, антиген p24 связывается со специфическими антигенами на твердой фазе образуя комплексы - МКА-p24-АТ-биотин. После 6 кратного отмывания в лунки вносят стрептавидин, меченный пероксидазой, который взаимодействует с биотином. После инкубации и отмывания несвязанных компонентов в лунки добавляют раствор проявителя - субстрат

### Особенности и преимущества тест-системы

- Высокая чувствительность и специфичность.
- Использование высокоочищенных и высокоспецифичных рекомбинантных белков в составе иммуносорбента и иммуноферментного конъюгата.
- Возможность выявления всех классов вирусоспецифичных иммуноглобулинов, что обуславливает высокую чувствительность тест-системы в период ранней сероконверсии.
- Одновременная инкубация сывороток и конъюгата в лунках планшета.
- Визуальный контроль внесения образцов сыворотки или плазмы крови в лунки планшета за счет изменения цвета раствора.
- Открытая система, легко адаптируемая к условиям рутинного серологического тестирования.
- Общепринятая стандартизация учета результатов.
- Продолжительность анализа 2,5 часа.
- Один набор рассчитан на 192 анализов.
- Разные варианты комплектации наборов по выбору потребителя: стриповый или монолитный планшет, хромоген ТМБ или ОФД.
- Срок годности 15 месяцев.

### DIA-HIV1/2

#### тест-система иммуноферментная III поколения для выявления специфичных антител против ВИЧ 1/2

«DIA-HIV 1/2» - тест-набор, предназначенный для выявления суммарных (IgG, IgM, IgA) антител против ВИЧ-1 и ВИЧ-2 в сыворотке и плазме крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

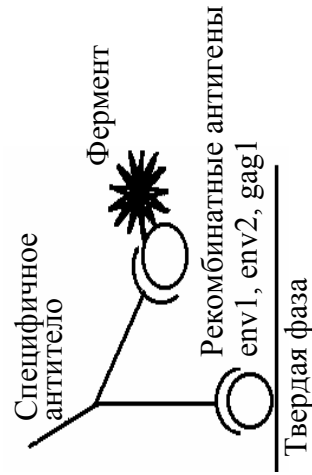
Характерной особенностью тест-набора является сбалансированность всех его компонентов, использование высокоочищенных и специфических рекомбинантных белков в составе иммуносорбента и иммуноферментного конъюгата, оригинальная и оптимальная рецептура растворов. Все это, как и ряд ноу-хау в технологии производства данной продукции, предопределяют высокие показатели качества тест-системы «DIA-HIV 1/2», в частности, высокую чувствительность и специфичность, возможность обнаруживать антитела к ВИЧ первого и второго типов на ранних этапах инфекции.

### Принцип анализа

Основные компоненты набора «DIA-HIV 1/2» - иммуносорбент и иммуноферментный конъюгат. Иммуносорбент представляет собой стриповый полистироловый планшет, в лунках которого засорбированы рекомбинантные полипептиды - аналоги антигенов ВИЧ 1 - env-1 (gp120, gp41), gag-1 (p24, p17) и ВИЧ 2 - env-2 (gp36). Конъюгат представляет собой смесь рекомбинантных полипептидов - аналогов белков ВИЧ 1 (env-1, gag-1) и ВИЧ 2 (env-2), конъюгированных с пероксидазой хрена.

Процесс анализа - это поэтапная процедура с одновременной инкубацией исследуемых сывороток и конъюгата. При внесении у лунки планшетов конъюгата и образцов сывороток крови, ВИЧ-специфические антитела, если они находятся в

сыворотке, связываются, как с рекомбинантными антигенами на твердой фазе, так и с антигенами иммунопероксидазного конъюгата, образуя комплексы антиген-антитело. После отмывания в лунки прибавляют раствор проявителя, который содержит субстрат пероксидазы (перекись водорода) и хромоген (ОФД или ТМБ). При наличии в комплексе на твердой фазе иммунопероксидазного конъюгата раствор окрашивается.



Пероксидазную реакцию останавливают, прибавляя стоп-реагент и измеряют оптическую плотность при 492/620 нм (при использовании хромогена ОФД) или 450/620 нм (при использовании хромогена ТМБ).

На схеме 1 показана поэтапная последовательность проведения иммуноферментной реакции на тест-системе «DIA-HIV 1/2»

### Специфичность

Определение специфичности тест-системы «DIA-HIV 1/2» проводили как при исследовании популяции с низким риском инфицирования (доноры крови), так и лиц из групп высокого риска инфицирования (инъекционные наркоманы), а также на образцах сывороток крови медицинских работников, беременных женщин и образцах интерферентной группы пациентов. К последней группе относили сыворотки от больных разными инфекционными заболеваниями, которые классифицируются, как гепатиты В и С, ЦМВ-инфекция, герпетическая инфекция, туберкулез, краснуха, сифилис. Данные приведены в таблице 4.

Таблица 4. Определение специфичности тест-системы «DIA-HIV 1/2» на образцах сывороток разных групп пациентов

Исследуемая группа	Количество исследований	Количество отрицательных результатов в «DIA-HIV 1/2»	Специфичность, %
Доноры крови	221541	221098	99.7
Медработники	1643	1636	99.6
Беременные	2481	2468	99.5
Инъекционные наркоманы	82	82	100
Больные с интерферентными заболеваниями	309	307	99.3

При тестировании образцов сывороток крови всех групп исследуемых лиц, тест-система «DIA-HIV 1/2» демонстрирует высокую специфичность.

При исследовании специфичности тест-системы на панели отрицательных сывороток производства ГИСК им. Л.А. Тарасевича не было получено ложноположительных результатов.




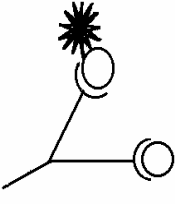
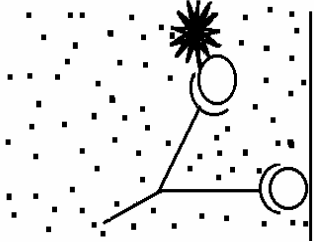
Таблица 3. Оценка информативности тест-системы „DIA-HIV 1/2” на сероконверсионных панелях сывороток

Панель	№ образца	Enzygnost Anti-HIV 1/2 Plus	Viro-nostika HIV Uni-form II Plus	DIA-HIV 1/2	Панель	№ образца	Enzygnost Anti-HIV 1/2 Plus	Viro-nostika HIV Uni-form II Plus	DIA-HIV 1/2
BBI PRB 910 J	1-2	N	N	N	BBI PRB 930 AE	1-2	N	N	N
	3-7	P	P	P	BBI PRB 931 AF	2-4	P	P	P
BBI PRB 912 L	1	P	N	P	BBI PRB 932 AG	1-5	N	N	N
	2-6	P	P	P	BBI PRB 944 AT	6-9	P	P	P
BBI PRB 914 N	1-5	P	P	P	BBI PRB 944 AT	1-3	N	N	N
	1-4	N	N	N	BBI PRB 944 AT	4	P	N	P
BBI PRB 917 Q	5-7	P	P	P	BBI PRB 944 AT	5-9	P	P	P
	1	N	N	N	BBI PRB 944 AT	1-4	N	N	N
BBI PRB 927 AB	2-5	P	P	P	BBI PRB 944 AT	5-6	P	P	P
	1	N	N	N	BBI PRB 944 AT	1-9	N	N	N
BBI PRB 928 AC	2-5	P	P	P	BBI PRB 944 AT	10-13	P	P	P
					BBI PRB 944 AT				

P - положительный; N - отрицательный

Схема 1. Проведение ИФА на тест-системе «DIA-HIV 1/2»

Этапы проведения анализа

Процедура	Формирование комплекса
<ul style="list-style-type: none"> <li>Полистироловые стрипы, сенсibilизированы белками env-1, env-2, gag-1</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Внесение в лунки по 60 мкл раствора конъюгата и по 30 мкл образцов контролей и сывороток</li> <li>Инкубация 90 мин. при 37 °С (формирование комплекса антиген-антитело с конъюгатом)</li> <li>Промывка 8 раз буферным раствором</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Внесение в лунки по 100 мкл раствора проявителя (перекись водорода и хромоген)</li> <li>Инкубация 30 мин. при комнатной температуре (окраска)</li> <li>Остановка реакции добавлением стоп-реагента</li> <li>Регистрация оптической плотности</li> </ul>	

### Характеристика показателей качества тест-системы «DIA-HIV 1/2»

#### **Чувствительность**

Определение чувствительности тест-системы «DIA-HIV 1/2» проводили на панелях охарактеризованных сывороток производства Boston Biomedica Inc. (США), Агентства по контролю безопасности лекарственных средств (AFSSAPS, Франция), Института эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л.В. Громашевского АМН Украины (ИЕИБ), Государственного института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича (ГИСК, Россия). В таблице 1 приведены характеристики панелей сывороток.

Таблица 1. Характеристика панелей сывороток

Панель	Характеристика образцов сывороток панели
PRB106 (BB1)	анти-ВИЧ-1 низкотитражные (14), анти-ВИЧ отрицательная (1)
PRB107 (BB1)	анти-ВИЧ-1 низкотитражные (14), анти-ВИЧ отрицательная (1)
AFSSAPS	ВИЧ-1 предсероконверсия (2), ВИЧ-1 ранняя сероконверсия (13), ВИЧ-1 разных субтипов (10), ВИЧ-2 положительные (10), отрицательные перекрестно-реагирующие (5)
ИЕИБ	ВИЧ-1 ранняя сероконверсия (16), ВИЧ-1 носительство (15), СПИД-ассоциированный комплекс (8), СПИД (7), от ВИЧ-1 инфицированных новорожденных (10), от доноров крови (46)
ГИСК	анти-ВИЧ-1 положительные (16), анти-ВИЧ-2 положительные (8)

Результаты определения чувствительности тест-системы «DIA-HIV 1/2» на вышеупомянутых панелях представлены в таблице 2.

Таблица 2. Определение чувствительности тест-системы «DIA-HIV 1/2» на панелях сывороток

Панель	Количество положительных образцов из общего числа образцов В панели	Количество положительных результатов В наборе «DIA-HIV 1/2»
PRB106	14 из 15	14
PRB107	14 из 15	14
AFSSAPS	33 из 40	33
ИЕИБ	54 из 100	54
ГИСК ВИЧ1	16 из 16	16
ГИСК ВИЧ2	8 из 8	8

Так же чувствительность тест-системы оценивали при использовании 346 образцов сывороток крови от ВИЧ-1 инфицированных лиц, 78 образцов, содержащих антитела к ВИЧ-2 и 2 образца от лиц, инфицированных ВИЧ-О. При этом все образцы были признаны как положительные.

Способность тест-системы «DIA-HIV 1/2» обнаруживать раннюю сероконверсию была определена при тестировании 11 сероконверсионных панелей (Boston Biomedica Inc., BioClinical Partners Inc.). Согласно полученным результатам, тест-система «DIA-HIV 1/2» дает возможность обнаруживать ВИЧ-инфекцию у пациентов на уровне чувствительности тест-наборов третьего поколения для выявления антител к ВИЧ импортных производителей. Результаты этих исследований представлены в таблице 3.