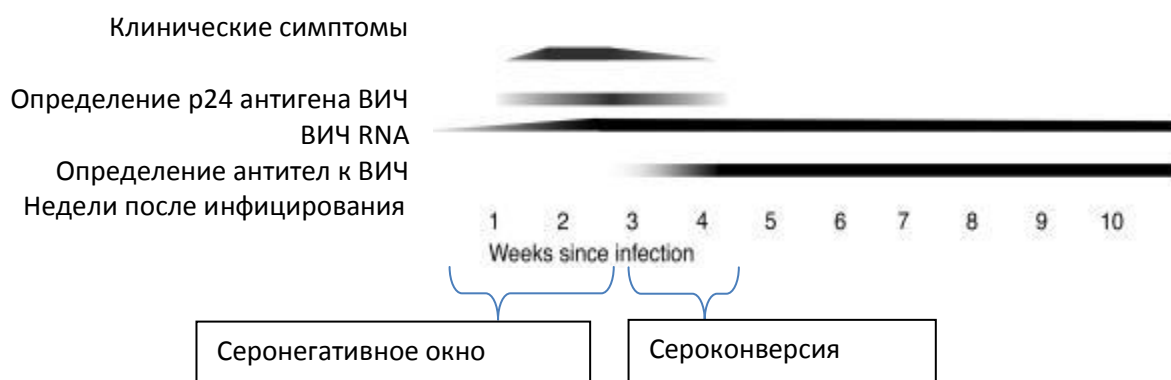


# Бесприборные тесты нового 4-го поколения для выявления маркеров ВИЧ-инфекции.

Дробченко А.Е., ЗАО БИОГРАД, Санкт-Петербург



Во время острой стадии ВИЧ-инфекции, вирус размножается быстро, достигая высоких уровней виремии, т.к. организм еще не запустил механизм борьбы с вирусом - антитела отсутствуют, это так называемый период «серонегативного окна», который может длиться от нескольких дней до 1-3 месяцев после инфицирования.

Тесты 3-его поколения, направленные на выявление антител к ВИЧ не диагностируют эту стадию. Так как антител еще нет, то концентрация вируса может быть очень высокой, что увеличивает вероятность передачи ВИЧ.

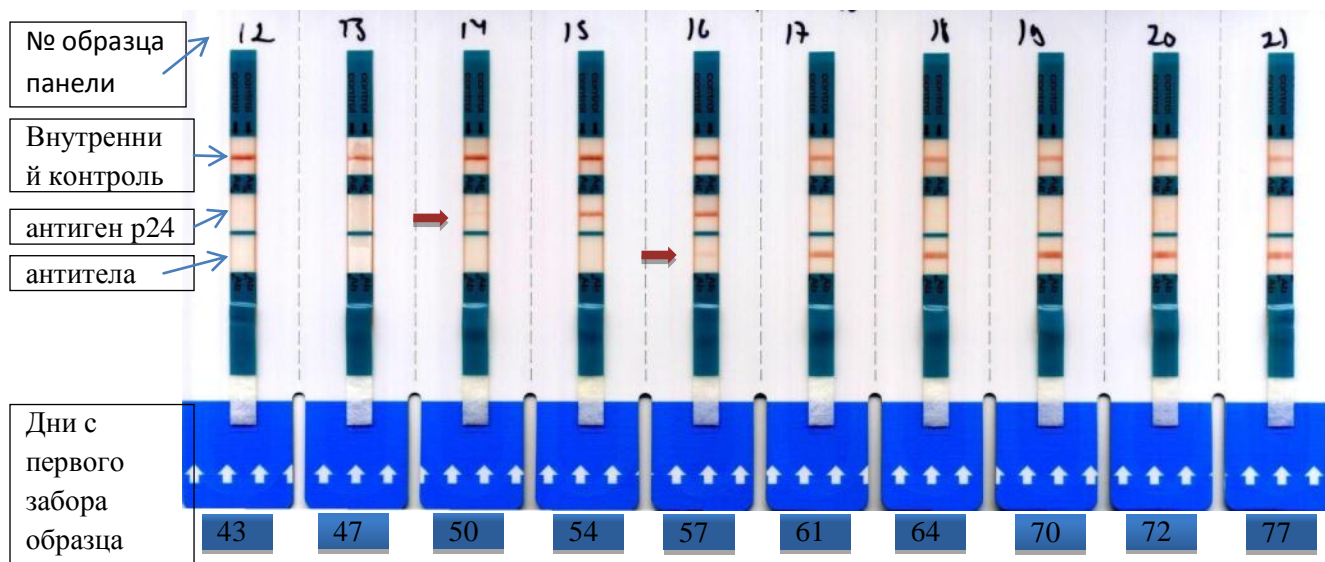
Тесты 4-го поколения способны выявлять не только антитела, но и антиген ВИЧ p-24, поэтому они могут определять ВИЧ-инфекцию раньше тестов 3-го поколения в период «серонегативного окна». В системе здравоохранения многих стран, в том числе РФ, преимущественно применяются ИФА тесты 4-го поколения, так называемые тесты ВИЧ Антиген /Антитело или АГ-АТ. В Донорской службе крови РФ применение тестов только 4-го поколения закреплено законодательно.

В своем докладе я хочу подробнее остановиться на первых в мире бесприборных тестах для одновременного выявления антител к ВИЧ 1/2 и антигена ВИЧ-1 p24, обладающих способностью определять ВИЧ на острой стадии:

1. первом в мире ИХА экспресс - тесте Детермин ВИЧ 1/2 Аг/Ат Комбо (тест ВИЧ Антиген /Антитело)
2. бесприборной иммуноферментной тест-системе ИммуноКомб ВИЧ 1&2 ТриСпот Аг-Ат (тест ВИЧ Антиген /Антитело)

Как эти тесты выглядят на практике?

На рисунке представлен пример определения образцов сероконверсионной панели на примере панели Zeptometrix (BCP) 6246 (США) тестом Alere Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo (тест ВИЧ Антиген /Антитело)



Данный тест позволяет одновременно определять антитела к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 (нижняя полоса) и антиген p24 ВИЧ-1 (средняя полоса). Верхняя полоса является внутренним контролем.

Как видно из рисунка, сначала тест определяет наличие антигена p24 (с 14-го образца), при этом полоса антигена является слабой, затем интенсивность полосы антигена растет (15-16 образец) и, начиная с 16 образца, появляется слабая полоса антител. Далее интенсивность полосы антител возрастает, а полоса антигена исчезает полностью.

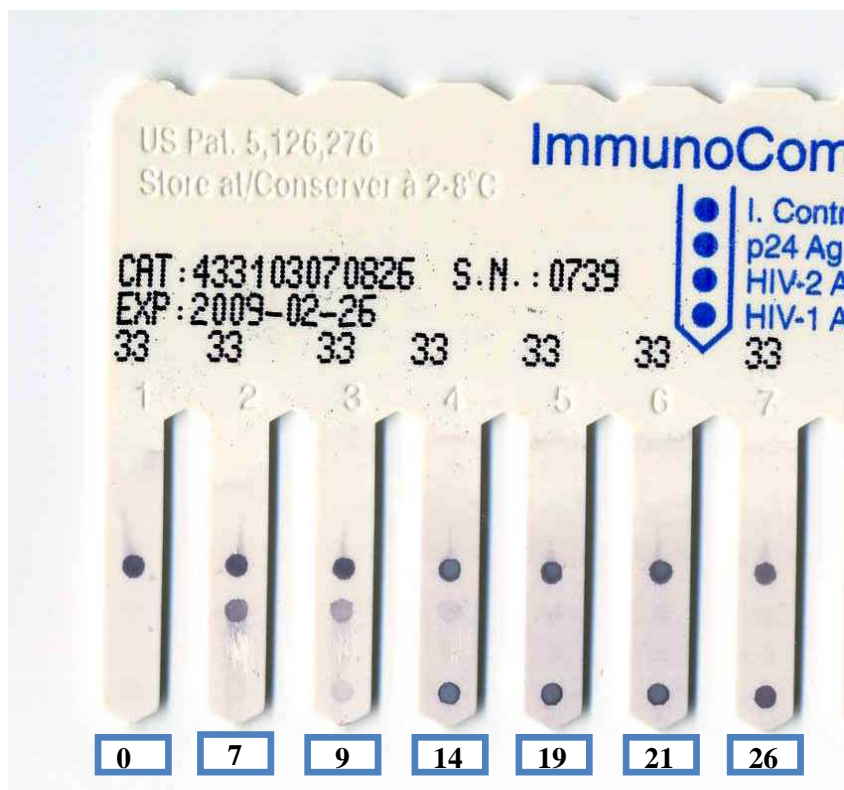
Что это значит на практике? Тесты третьего поколения не определяют ВИЧ-положительные образцы 14 и 15, на которые приходится наибольшая концентрация вируса в крови. В то же самое время применение теста ВИЧ Антиген /Антитело 4-го поколения позволит выявить ВИЧ на 7 дней раньше на образцах данной панели.

Испытания теста Alere Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo (тест ВИЧ Антиген /Антитело) на сероконверсионных панелях по сравнению с Alere Determine™ HIV-1/2 (тест 3-го поколения):

Всего испытано 33 сероконверсионных панели	Ag/Ab Combo определяет ВИЧ раньше	Оба теста определяют ВИЧ с одного и того же образца	Ag/Ab Combo определяет ВИЧ позже
Кол-во сероконверсионных панелей	23 (на 2-20 дней раньше)	10	0

Как видно из представленных данных Alere Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo выявляет ВИЧ-инфекцию на 2-20 дней раньше, чем тесты 3-го поколения.

Ниже приведены результаты работы бесприборной ИФА тест-системы 4-го поколения ИммуноКомб II ВИЧ 1+2 ТриСпот Аг-Ат (тест ВИЧ Антиген /Антитело) на сероконверсионной панели ВВІ ВІ



Дней с забора 1-го образца

Как видно из рисунка, антитела к ВИЧ-1 данной тест-системой выявляются, начиная с 3 образца панели. Антитела к ВИЧ-2 в данной панели отсутствуют. Антиген ВИЧ-1 p24 выявляется, начиная со 2 образца. Точка антигена очень интенсивна, что указывает на то, что вероятнее всего антиген был бы выявлен и в более ранних образцах в течение 7 дней между образцами 1 и 2. Далее, начиная с 3 образца, интенсивность точки антигена начинает падать, в то время как интенсивность точки антител к ВИЧ-1 растет.

На следующем слайде показаны испытания ИФА тест-системы ИммуноКомб II ВИЧ 1+2 ТриСпот Аг-Ат (тест ВИЧ Антиген /Антитело) на 14 панелях ВВІ:

Панель ВВІ	Референс p24 тест	Референс ИФА 3-го поколения	ИммуноКомб II ВИЧ 1+2 ТриСпот Аг-Ат		Раньше, чем Референс ИФА 3-го поколения. Дни
			ВИЧ-1 p24 Аг	ВИЧ-1 Ат	
ВВІ – J	14	26	14	26	12
ВВІ – Q	53	60	53	60	7
ВВІ – R	0	2	0	2	2
ВВІ – V	0	4	0	4	4
ВВІ – W	37	47	37	47	10
ВВІ – АВ	28	33	28	33	5
ВВІ – АЕ	0	7	0	7	7
ВВІ – АF	15	28	15	28	13
ВВІ – АТ	2	14	7	14	7
ВВІ – ВА	8	19	11	19	8
ВВІ – ВВ	10	17	10	14	7
ВВІ – ВЕ	3	12	3	12	9
ВВІ – ВF	47	50	47	50	3
ВВІ – ВІ	0	9	7	9	2

Как видно из таблицы, ИФА тест-система ИммуноКомб II ВИЧ 1+2 ТриСпот Аг-Ат выявляет антиген и антитела практически всегда одновременно с референс тестами соответственно на антиген р24 и антитела. При этом антиген появляется в крови раньше антител на 2-13 дней, что позволяет данной тест-системе опережать тесты третьего поколения на соответствующий срок.

Современные ИФА тесты для одновременного определения антигена и антител к ВИЧ дают результат как единый ответ о наличии ВИЧ-инфекции. Несмотря на увеличенную чувствительность, эти тесты не дифференцируют результаты по антигену и антителам, что не позволяет интерпретировать статус инфекции на ранних стадиях.

Отличительным качеством бесприборной ИФА тест-системы ИммуноКомб II ВИЧ 1+2 ТриСпот Аг-Ат и экспресс - теста Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo является дифференцированное определение антигена ВИЧ р24 и антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 в одном анализе. Это позволяет определить статус каждого из маркеров, что особенно важно в период серонегативного окна.

Экспресс-тест Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo (тест ВИЧ Антиген /Антитело) производится в Японии корпорацией Alere™ – мировым лидером в производстве быстрых тестов для определения ВИЧ. Тест предназначен для выявления р24 антигена ВИЧ и антител к ВИЧ-1/ВИЧ-2 в сыворотке, плазме или цельной крови у инфицированных ВИЧ пациентов, позволяя сократить период «серонегативного окна» и сроки выявления сероконверсии у ВИЧ-инфицированных от 2 до 20 дней. Выпускается в формате тест-карт - по 10 тест-полосок, герметично упакованных в фольгу. Каждая тест-полоска упакована в легко снимаемую перед анализом фольгу.



Для проведения анализа следует отделить одну тест-полоску от тест - карты. Отрывать полоски следует по перфорации с правой стороны тест - карты, начиная сверху, чтобы на карте сохранялся номер, напечатанный на левой стороне карты. Удалить защитную фольгу с тест - полоски и нанести 50 мкл образца сыворотки или плазмы. Через 15 минут результат появляется в виде окрашенных полос в зоне результата. Для работы с цельной пальцевой или венозной кровью после внесения образца добавляется 1 капля буфера. Цельную кровь удобно добавлять с помощью специальных капиллярных трубок, покрытых ЭДТА. При наличии в образце антител к ВИЧ-1, ВИЧ-1 группы О и/или ВИЧ- 2 в окне “Ab” и окне “Control” появятся красные полосы.

Если антиген р24 ВИЧ присутствует в образце, формируется красная полоса в области окна антигена (обозначенного “Ag”) и вторая в окне “Control”.

При отсутствии антител к ВИЧ и антигена р24 только одна полоса появится в окне “Control”.

### **Постановка теста Детермин ВИЧ с цельной кровью:**

### Отделите по перфорации тест-полоску

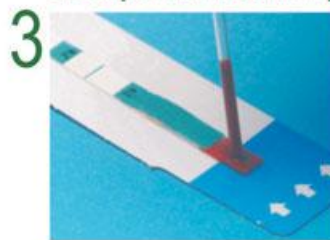


Отрывать по перфорации тест-полоски следует с правой стороны карты, начиная сверху, с тем, чтобы на карте сохранился номер серии, напечатанный на левой стороне карты

### Удалите защитную фольгу



### Нанесите тестируемый сыворотки/плазмы крови



Нанесите 50 мкл образца цельной крови, полученной из пальца или из вены, с помощью микропипетки или покрытого ЭДТА капилляра на стартовую зону тест-полоски (помечена стрелками)



Подождите 1 минуту

### Добавьте буфер

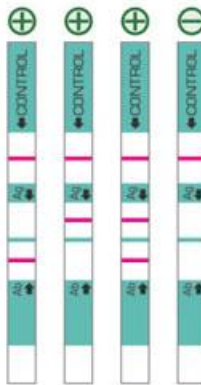


Нанесите из капельницы, располагаемой строго вертикально, 1 каплю буфера на стартовую зону тест-полоски



Подождите 15 минут

### Прочтите результат



### Недействительные (отсутствует контрольная полоса)



## Постановка теста Детермин ВИЧ с сывороткой или плазмой:

### Отделите по перфорации тест-полоску



Отрывать по перфорации тест-полоски следует с правой стороны карты, начиная сверху, с тем, чтобы на карте сохранился номер серии, напечатанный на левой стороне карты

### Удалите защитную фольгу



### Нанесите тестируемый сыворотки/плазмы крови



Нанесите 50 мкл образца сыворотки/плазмы с помощью микропипетки на стартовую зону тест-полоски (помечена стрелками)



Подождите 15 минут

### Прочтите результат



### Недействительные (отсутствует контрольная полоса)



Чувствительность теста Alere Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo составила 100%:



Типы и субтипы ВИЧ	Количество протестированных положительных образцов	Определены как «положительные» в тесте Determine® HIV-1/2 Ag/Ab Combo	Чувствительность %
ВИЧ-1	885	885	<b>100%</b>
ВИЧ-1 группы О	7	7	<b>100%</b>
ВИЧ-1, субтипы, не В*	154	154	<b>100%</b>
ВИЧ-2	133	133	<b>100%</b>
<b>ВСЕГО:</b>	<b>1179</b>	<b>1179</b>	<b>100%</b>

\*Субтипы ВИЧ-1 А, С, D, F,G, J, H, K и «циркулирующие рекомбинантные формы» (CRF) ВИЧ: AE, AG, AD, BD, 06, 09, 011

**Специфичность теста Alere Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab по линии антител-99.23 % по линии антигена p24 - 99.66 %:**

Образцы	Количество образцов	Отрицательные по антителам к ВИЧ	Специфичность (линия на АТ к ВИЧ)	Отрицательные по p24 АГ ВИЧ	Специфичность (линия p24 АГ ВИЧ)
Серонегативные	1783	1769	99.21 %	1776	99.61 %
От беременных	200	200	100.00 %	199	99.50 %
От пациентов с болезнями (не ВИЧ) или употребляющих потенциально интерферирующие субстанции	360	356	98.89 %	360	100.00 %
<b>Всего:</b>	<b>2343</b>	<b>2325</b>	<b>99.23 %</b>	<b>2335</b>	<b>99.66 %</b>

Данный тест является оптимальным для анонимного тестирования, поскольку обеспечивает максимум информации для после - тестового консультирования на первом приеме, при обследовании в мобильных пунктах. Определение ВИЧ на ранних стадиях, во время т.н. серонегативного окна, особенно важно в случае обращения пациентов после потенциально опасного контакта.

На следующем слайде представлены экспресс-тесты Детермин для определения наиболее значимых инфекций:

ВИЧ Alere Determine™ HIV-1/2

- один из наиболее популярных и испытанных экспресс-тестов на ВИЧ в мире. Согласно опубликованным (ВОЗ) результатам сравнительных испытаний, является одним из самых чувствительных, специфичных, надежных и удобных для считывания экспресс-тестов.

Alere Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo (тест ВИЧ Антиген /Антитело)

Гепатит В Alere Determine™ HBsAg

Сифилис Alere Determine™ Syphilis TP

Туберкулез (ВИЧ +) Alere Determine™ TB LAM Ag \*

Тесты Детермин зарегистрированы Росздравнадзором, имеют CE-марку. 8 августа 2013 года Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) одобрило медицинское применение первого в мире экспресс-теста 4-го поколения Alere Determine HIV-1/2 Ag/Ab Combo (Тест ВИЧ антиген /антитело). По результатам испытаний и инспекций производства тесты Детермин включены в список преквалифицированных диагностических продуктов Всемирной Организацией здравоохранения (ВОЗ). Поставляется в рамках программ ВОЗ, ЮНИСЕФ, Глобального Фонда. По программам Глобального фонда и ВОЗ в 2009-2011годах было закуплено на сумму 130 350 874\$ экспресс-тестов на ВИЧ. 56% от объема закупок Глобального фонда и 87% закупок ВОЗ составляют экспресс-тесты Determine™ HIV-1/2 и Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo.

ИФА тест-системы ИммуноКомб HIV 1&2 TriSpot Ag-Ab, предназначенные для дифференцированного определения антител к ВИЧ-1(включая ВИЧ-О), ВИЧ-2 и антигена ВИЧ1 p24,

могут использоваться с целью выдачи заключения о наличии или отсутствии ВИЧ-инфекции как на первом этапе (скрининговая лаборатория), так и на втором этапе (референс-лаборатория) для исследования сыворотки и определения p24. В тест-системе ИммуноКомб II ВИЧ 1+2 ТриСпот Аг-Ат применен прямой твердофазный ИФА. Твердой фазой является пластиковый Гребень, на поверхность зубцов которого в разных местах нанесены: моноклональные антитела к антигену ВИЧ p24, антиген ВИЧ-1 gp41, антиген ВИЧ-2 gp36 и биотинилированный БСА (внутренний контроль). Результат оценивается через 84 минуты визуально или при помощи прибора КомбСкан.

На следующем слайде приведены данные по чувствительности ИммуноКомб II ВИЧ 1+2 ТриСпот Аг-Ат. Испытания были проведены в нескольких центрах Европы (Бельгии, Франции, Израиля) на 1 046 ВИЧ-положительных образцах, в том числе образцы с острой формы и недавней ВИЧ-инфицированности.

#### Чувствительность теста «ИммуноКомб® II ВИЧ 1+ 2 ТриСпот Аг-Ab»

Центры проведения испытаний	Количество положительных проб	Антитела к ВИЧ-1	Антитела к ВИЧ-2	Антиген ВИЧ-1 p24
		Чувствительность %		
Орженикс (Израиль)	552	100	100	100
Rambam (Израиль)	127	100	Не определялась	100
JONESSE (Франция)	163	100	100	100
Институт тропической медицины (Бельгия)	204	100	98,8	100
Итого	1 046	100	99,6	100

Чувствительность ИФА тест-системы ИммуноКомб II ВИЧ 1+2 ТриСпот Аг-Ат - 100% по ВИЧ1 и p24 .

Чувствительность по антигену ВИЧ p24 при исследовании образцов с ранних стадий первичной ВИЧ инфекции составляет 5 пг/мл, включая группу O. При исследовании образцов с известным количеством антигена ВИЧ p24, была продемонстрирована способность определения антигена p24 в концентрации до 1.5 пг/мл.

Специфичность тест-системы ИммуноКомб® II ВИЧ 1+2 ТриСпот Аг-Ab проверялась на 1 982 ВИЧ-отрицательных образцах, среди которых было 462 образца от пациентов с различными инфекционными (гепатитом А, В, С, HTLV, CMV, HSV, EBV, малярией и вакцинированные против вируса гриппа) и неинфекционными заболеваниями и 190 образцов групп высокого риска.

Данные приведены на следующем слайде.

Специфичность теста «ИммуноКомб<sup>®</sup> II ВИЧ 1+ 2 ТриСпот Ag-Ab»

Центры проведения испытаний	Количество отрицательных проб	Антитела к ВИЧ-1	Антитела к ВИЧ-2	Антиген ВИЧ-1 p 24
		Специфичность%		
Орженикс (Израиль)	1 373	99,8	100	99,8
Rambam (Израиль)	111	100	100	99,1
JONESSE (Франция)	298	99	100	100
Институт тропической медицины (Бельгия)	200	98	100	99,5
Итого	1 982	99,5	100	99,8

Специфичность ИФА тест-системы ИммуноКомб II ВИЧ 1+2 ТриСпот Ag-Ab: антитела к ВИЧ-1 - 99.5%, антитела к ВИЧ-2 - 100%, антиген p24 — 99.8%.

#### Заключение

Тесты 4-го поколения Alere Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo и ИммуноКомб II ВИЧ 1+2 ТриСпот Ag-Ab способны выявлять ВИЧ-инфекцию на ранней стадии, еще до появления определяемых титров антител, в так называемый период серонегативного окна. Это особенно важно, поскольку наибольший риск передачи ВИЧ приходится именно на раннюю стадию.