

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ВИЧ

к.х.н. Дробченко С.Н., проф. Кальво А., проф. Сэмюэльс Ф.

ЗАО «Биоград», Санкт-Петербург, Orgenics LTD, Израиль, Orgenics PBS, Франция

В Санитарно-эпидемиологических правилах СП 3.1.5.2826 -10 «Профилактика ВИЧ-инфекции», утверждённых 11.01.2011, указано: Каждое исследование на простых быстрых тестах должно сопровождаться параллельным исследованием на ИФА тест-системах.

Быстрые простые тесты, основанные на методе иммунохроматографии, для визуализации результата анализа используют окрашивание комплекса не ферментативными частицами. Эти тесты имеют минимальное время реакции; принцип анализа, отличный от классического иммуноферментного анализа (ИФА); чувствительность и специфичность ниже показателей ИФА; визуальное считывание; нестабильные результаты.

ИФА тест-системы позволяют выявлять комплекс антиген-антитело с помощью субстрата, который расщепляется ферментом с появлением окрашивания (ферментативное окрашивание) характеризуются более высокой чувствительностью и специфичностью, чем ИХА тесты. При ферментативном окрашивании для достижения окраски требуется меньшее количество комплексов антиген-антитело, так как каталитические свойства ферментов позволяют действовать им в качестве усилителей: одна молекула фермента может способствовать образованию более $1 \cdot 10^5$ молекул продукта каталитической реакции в минуту, при этом реакция фермента с субстратом высокоспецифичная. Для производства ИФА тест-систем наиболее часто используются такие ферменты как пероксидаза и щелочная фосфатаза. В связи с тем, что фермент обладает уникальным своего рода усиливающим свойством, чувствительность ИФА тест-систем зависит от правильного выбора фермента.

Все Российские и часть зарубежных производителей планшетных ИФА тест-систем используют фермент-пероксидазу хрена из-за относительно невысокой стоимостью, легкости очистки и большого выбора субстратов. Фермент - щелочная фосфатаза, используемый ведущими зарубежными фирмами, имеет целый ряд преимуществ перед пероксидазой: более высокая стабильность и использование хромогенного субстрата с высокой удельной хромофорной активностью, применение которого резко повышает чувствительность анализа. Французское агентство по контролю за медикаментами (ADA), оценивая тесты, разрешенные для использования в клиниках Европы, подчеркивает, что использование фосфатазно-щелочного конъюгата позволяет достичь наиболее высокой чувствительности по сравнению с тестами, основанными на пероксидазной реакции.

В ИФА тест-системах ИммуноКомб, производства Orgenics Ltd и планшетных ИФА тест-системах ведущих зарубежных фирм Bio-Rad, Abbott, Roche применена ферментативная реакция окрашивания на основе щелочной фосфатазы, позволяющая достичь высокой чувствительности при выявлении антител к ВИЧ, в т.ч. в ранних сероконверсионных сыворотках. Возможность выявления низкоаффинных антител к ВИЧ, характерных для первых дней инфицирования, при использовании ИФА тест-систем ИммуноКомб подтверждена испытаниями ВОЗ, FDA и Государственными испытаниями России. Отличительной особенностью ИФА тест-систем ИммуноКомб является быстрота получения результата анализа (36 мин), возможность проведения индивидуального анализа, визуального или приборного учета результатов. Тест-системы ИммуноКомб позволяют проводить полноценный иммуноферментный анализ, поэтому повтора отрицательного результата не требуют.

В данной работе проанализированы результаты Российских государственных сравнительных испытаний тестов для бесприборной диагностики ВИЧ, поставляемых в рамках Национального Приоритетного проекта Здоровье, и данные ВОЗ по аналогичным тест-системам. Исходя из приведенных данных по чувствительности, специфичности тестов и распространённости ВИЧ в России, рассчитана прогностическая ценность положительного результата (PPV) теста.

Отличительной особенностью тест-систем ИммуноКомб является проведение полноценного иммуноферментного анализа без использования оборудования за короткий промежуток времени и возможность постановки индивидуального анализа.

На следующем слайде представлены иммуноферментные тест-системы ИммуноКомб, предназначенные для диагностики ВИЧ-инфекции.

Наименование теста ИммуноКомб II	Определяемый показатель	Чувствительность	Специфичность	Кол-во тестов/ время анализа	Кол-во образца, мкл
HIV1&2 BiSpot	Антитела к ВИЧ1 и ВИЧ2 (отдельно)	100,00%	99,70%	36 / 36 мин	50
HIV 1&2 CombFirm (рекомбинантный блот)	Подтверждающий, спектр антител к ВИЧ	99,70%	100,00%	18 / 66 мин	50
HIV 1&2 TriSpot Ag-Ab (Аг-Ат)	Отдельно антитела к ВИЧ1, ВИЧ2 и антиген ВИЧ1 p24. Чувствительность по p24 5 пг/мл	100,00%	антитела к ВИЧ-1 99.5% антитела к ВИЧ-2 100%, антиген p24 — 99.8%.	36 / 84 мин	50

ИФА тест-система **ИммуноКомб HIV1&2 BiSpot** предназначена для дифференцированного определения антител к ВИЧ-1(включая ВИЧ-О), ВИЧ-2. Данная тест-система может использоваться скрининговой лабораторией на первом этапе диагностики с целью выдачи заключения о наличии или отсутствии ВИЧ-инфекции. При исследовании на ВИЧ с применением простых/быстрых ИФА тестов для параллельного исследования той же порции крови классическими методами ИФА можно использовать тест-системы **ИммуноКомб HIV1&2 BiSpot**. На втором этапе в референс-лаборатории ИФА тест-система **ИммуноКомб HIV1&2 BiSpot** может использоваться в качестве второй ИФА тест-системы, отличающейся по формату от планшетных ИФА.

Тесты ИммуноКомб выполнены в оригинальном формате ИммуноГребней (Слайд с постановкой анализа). Такой формат, с твердой фазой ИФА анализа, расположенной на выступах-зубцах полимерного Гребня, позволяет переносить твердую фазу между растворами реагентов, необходимых для проведения ИФА. Все необходимые реагенты: разбавитель образца, промывочные растворы, конъюгат, помещены производителем в лунки планшеты - Проявочной Ванны. В отличие от планшетного ИФА, где в лунки планшеты, содержащей твердую фазу анализа, последовательно заливаются необходимые реагенты, перенос твердой фазы между лунками планшеты, содержащей готовые растворы, значительно проще осуществлять вручную, без использования дорогостоящего оборудования, при этом процесс промывки от неспецифических взаимодействий и образование комплекса на твердой фазе обеспечивает более высокую специфичность и чувствительность. Это позволило фирме Орженикс создать и запатентовать тест, воспроизводящий классический ИФА без использования оборудования за меньшее время (36 минут) и с возможностью индивидуального анализа. Для обеспечения высокой чувствительности тестов ИммуноКомб подобрана ферментативная реакция с использованием фосфатазно-щелочного конъюгата. Результаты анализа проявляются в виде серо-голубых точек на зубцах Гребня, при этом окраска формируется на твердой фазе и стабильна после остановки реакции, что позволяет документировать результаты анализа. Результат оценивается через 36 минут на приборе КомбСкан или визуально. В тесте предусмотрен также внутренний контроль (третья точка), подтверждающий достоверность проведенного анализа и сохранность реагентов во время транспортировки и хранения.

На слайде приведены результаты испытаний тест-систем на сероконверсионной панели HIV 9017 **BioClinical Partners Inc.** Слева приведены результаты испытаний производителем сероконверсионной панели HIV 9017 планшетных ИФА тест-систем, предназначенных для выявления антител к ВИЧ и совместного выявления антител и антигена p24. Справа - результаты Российских Государственных испытаний тестов для экспресс-диагностики ВИЧ на той же сероконверсионной панели.

Слайд: Результаты испытаний тест-систем на сероконверсионной панели HIV 9017

Результаты испытаний ИФА(ELISA)тест-систем на сероконверсионной панели HIV 9017. Данные производителя BioClinical Partners Inc., Franklin, MA, 02038, USA Seroconversion Panel Catalog no. HIV 9017						Результаты испытаний бесприборных тестов на сероконверсионной панели HIV 9017. Отчет о сравнительных испытаниях диагностических иммуноферментных тест-систем для выявления антител к ВИЧ, разрешенных к применению в РФ, МЗ РФ 22.03.04, таблица 24				
№ образца	Дата за-бора образца	Abbott AxSYM Anti-HIV1/2	Organon Vironostika HIV Uni-Form II Ag/Ab	Roche Enzymum-Test HIV Combi	Abbott Architect HIV Ag/Ab Combo	Serodia HIV-1/2, ИХА	ИммуноКомб II ВИЧ 1+2 БиСпот, ИФА	Genie II HIV-1/ HIV-2, ИХА	Determine HIV ½, ИХА	Retrocheck, ИХА
1	26.12.97	0,31	0,47	0,23	0,74	-	-	-	-	-
2	29.12.97	0,31	0,50	0,23	0,19	-	-	-	-	-
3	02.01.98	0,39	0,48	0,25	-	-	-	-	-	-
4	05.01.98	0,40	0,52	0,25	0,15	-	-	-	-	-
5	09.01.98	0,68	0,57	0,31	-	-	-	-	-	-
6	12.01.98	0,93	0,69	0,57	0,43	-	+	-	-	-
7	16.01.98	1,01	0,62	1,40	1,12	-	+	-	-	-
8	19.01.98	1,43	0,80	1,96	1,58	-	+	-	-	-
9	23.01.98	2,28	1,08	3,17	2,88	-	+	-	-	+
10	27.01.98	3,51	1,45	3,39	-	+	+	+	+	+
11	30.01.98	4,12	1,70	4,43	5,16	+	+	+	+	+

Как видно из представленных данных, планшетные ИФА тест-системы производства Аббот и Roche выявляют антитела к ВИЧ с 7-го образца, производства Organon с 9-го образца сероконверсионной панели HIV 9017.

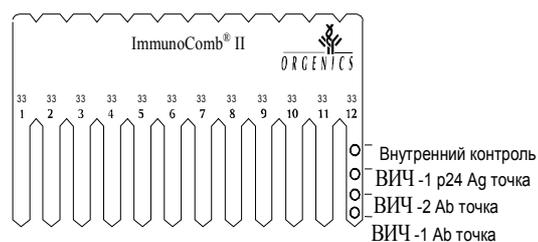
Результаты Российских Государственных сравнительных испытаний показали, что ИФА тест-система ИммуноКомб HIV1&2 BiSpot выявляет антитела к ВИЧ во всех образцах панели HIV 9017, начиная с 6-го, а тест Детермин - с 10-го образца данной панели. В соответствии с данными о дате забора образцов, приведенными во втором столбце таблицы, тесты **ИммуноКомб II ВИЧ 1+2 БиСпот** выявляют антитела к ВИЧ на **11-15 дней раньше**, чем экспресс-тесты, основанные на принципе иммунохроматографии, и на **4 -11 дней опережают** ИФА планшетные тест-системы известных зарубежных производителей, предназначенные как для выявления антител так и для совместного выявления антител и антигена.

Испытания, проведенные ВОЗ на сероконверсионных панелях показали, что тест ИммуноКомб II ВИЧ 1+2 БиСпот выявляет антитела к ВИЧ-1 на **8,5 дней раньше** ИФА референс-теста Enzygnost Anti-HIV 1/2 Plus. ИХА тесты Детермин HIV 1/2 и Ретрочек ВИЧ выявляли антитела позже референс теста.

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. Чувствительность по p24 - 5 пг/мл. При исследовании на ВИЧ с применением простых/быстрых ИХА тестов для параллельного исследования той же порции крови классическими методами ИФА можно использовать тест-системы **ИммуноКомб HIV 1&2 TriSpot Ag-Ab**. Результат оценивается через 84 минуты визуально или при помощи прибора КомбСкан.

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.

Слайд Гребень ИммуноКомб II ВИЧ 1+2 ТриСпот Ag-At



Отличительным качеством ИФА тест-системы ИммуноКомб II ВИЧ 1+2 ТриСпот Ag-At является дифференцированное определение антигена ВИЧ p24 и антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 в одном анализе. Это позволяет определить статус каждого из маркеров, что особенно важно в период «окна». В тест-системе ИммуноКомб II ВИЧ 1+2 ТриСпот Ag-At 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 визуально или на приборе КомбСкан.

На следующем слайде приведены данные по чувствительности ИммуноКомб II ВИЧ 1+2 ТриСпот Ag-At. 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 Ag-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 определялось	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 Ag-At - 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 до 1.5 пг/мл.

Специфичность тест-системы ИммуноКомб® II ВИЧ 1+2 ТриСпот Ag-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® 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%.

Для подтверждения результатов положительных по ВИЧ в ИФА используются 2 вида подтверждающих тестов:

«Лизатный иммуноблот» - Western Blot, спектр антигенов ВИЧ разделенных при помощи электрофореза. Антигены производятся из вирусного лизата.

К сильным сторонам лизатного иммуноблота можно отнести полный спектр определяемых антител. Слабыми сторонами являются высокая стоимость (до 5 раз выше, чем у рекомбинантных тестов), высокий процент неопределенных результатов, более сложная процедура постановки анализа и интерпретации результатов, более высокие требования к персоналу лабораторий.

«Рекомбинантный иммуноблот», иногда называют линейный иммуноблот - рекомбинантные или синтетические антигены ВИЧ. Антигены производятся отдельно и наносятся дискретно. Этим достигается минимизация контаминирующих веществ из клеточной культуры, которые могут давать ложные реакции. Процент неопределенных результатов ниже, чем у лизатных блотов.

На следующем слайде приведены характеристики иммуноблотов.

Наименование	Определяемые антигена:				Оборудование/ подготовка растворов	Конъюгат	Время анализа
	к Env ВИЧ 1	к Gag ВИЧ 1	к Pol ВИЧ 1	к Env ВИЧ 2			
ImmunoComb® II HIV 1&2 CombFirm ре- комбинантный	gp120, gp41	p24	p31	gp36	не требует/ не требует (все растворы гото- вы к примене- нию)	Конъюгат со щелоч- ной фос- фатазой	66 мин
Биосервис, Блот-ВИЧ 1/2 +0 рекомбинантный	gp160, gp41	p24/ p17	p51	gp110/ gp38	вакуумный на- сос и шейкер / приготовление растворов	Конъюгат с перокси- дазой хре- на	18-20 ча- сов
Эколаб ИФА Лайн-Блот ВИЧ- 1,2 рекомбинантный	gp160, gp41	p24	p51	gp36	вакуумный на- сос и шейкер / приготовление растворов	Конъюгат с перокси- дазой хре- на	18-20 ча- сов
Bio-Rad NEW LAV BLOT I лизатный	спектр gp160, gp41	спектр gp120 p24, p40, p55, p17	спектр p31, p51, p66	-	вакуумный на- сос и шейкер /восстановле- ние из концен- трата	Конъюгат со щелоч- ной фос- фатазой	3 часа

Подтверждающий тест **ИммуноКомб HIV 1&2 CombFirm**, рекомбинантный иммуноблот, может использоваться для подтверждения положительных результатов скрининговых исследований. Результат оценивается через 66 минут визуально или при помощи прибора КомбСкан.

ИммуноКомб ВИЧ 1,2 КомбФирм без дополнительного оборудования и манипуляций на приготовление растворов за 1 час позволяет подтвердить результаты скрининговых исследований. ИммуноКомб ВИЧ 1,2 КомбФирм включает в себя все необходимые антигены для установления положительного результата по любому из принятых критериев, включая критерий ВОЗ, рекомендованный в Российской Федерации.

Рекомбинантные антигены p24, gag ВИЧ-1 и ВИЧ-2, p31, pol ВИЧ-1 и ВИЧ-2, gp120, gp41 ВИЧ-1, синтетический пептид gp36 ВИЧ-2 и внутренний контроль-иммуноглобулины человека нанесены в 6 различных точках на 2 зубца пластикового Гребня.

Антигены наносятся отдельно в неизменных концентрациях и не содержат тканевых антигенов, которые могут загрязнять антигены, полученные из вирусных лизатов.

Слайд

Гребень ИммуноКомб ВИЧ 1+2 КомбФирм



Для проведения анализа не требуется приготовления или разведения растворов, все необходимые реагенты внесены производителем в Проявочные ванны. В набор входит 3 Проявочные ванны, 3 Гребня в алюминиевой фольге с влагопоглотителем, положительный и отрицательный контроли, перфоратор для вскрытия ячеек Проявочной ванны. Ряд А Проявочной ванны разделён на 6 ячеек для внесения 6 образцов, ряды В-Е разделены на 12 ячеек. Для постановки одного анализа требуется два зубца Гребня.

На следующем слайде приведены данные по чувствительности и специфичности теста «ИммуноКомб® II ВИЧ 1&2 КомбФирм». Испытания были проведены в нескольких центрах Европы на 559 образцах, включающих 154 отрицательных образца, 318 образцов от пациентов, инфицированных ВИЧ-1, 35 образцов, положительных по ELISA и неопределённых в WB, 52 образца, положительных по ELISA отрицательных в WB. Отрицательные образцы включали образцы от беременных женщин, от пациентов с аутоиммунными заболеваниями и вирусными гепатитами.

ВИЧ статус	Вестерн-блот	ИммуноКомб® II ВИЧ 1&2 КомбФирм				
		Отрицательные	ВИЧ1	ВИЧ2	ВИЧ1+ВИЧ2	Неопределённые
Отрицательные	260	242	0	0	0	18
Положительные						
ВИЧ1	424	0	409*	0	0	15
ВИЧ2	175	0	0	151	17	7
ВИЧ1+ВИЧ2	9	0	0	0	9	0
Неопределённые	117	54	6	0	0	57
Итого	985	296	415	151	26	97

* - включая 15 положительных по ВИЧ-1 группы О

Без учета неопределённых результатов:

чувствительность 100%,

специфичность 100%

Тесты ИммуноКомб сертифицированы CE и широко используются более чем в ста странах мира. Как достоверные, высокочувствительные и специфичные тесты ИммуноКомб отобраны для программ ВОЗ, UNAIDS, Красного Креста, допущены FDA (США) для поставок по специальным программам фонда Клинтона. В 2007-2008 годах тест-системы ИммуноКомб HIV1&2 ViSpot поставлялись в рамках приоритетного национального проекта в сфере здравоохранения для экспресс скрининга на наличие антител к ВИЧ. В 2009 году тест ИммуноКомб HIV 1&2 CombFirm, рекомбинантный иммуноблот, поставлялся в рамках приоритетного национального проекта в сфере здравоохранения для подтверждения результатов скрининга на наличие антител к ВИЧ. Минздравсоцразвития рекомендует тесты ИммуноКомб для обследования доноров крови, органов и тканей человека, скрининговых исследований; для подтверждения результатов скрининговых исследований (приказ № 292 от 30.07.2001, № 322 от 21.10.2002, № 336 от 07.09.2000).

В Санитарно-эпидемиологических правилах СП 3.1.5.2826 -10 «Профилактика ВИЧ-инфекции», утверждённых 11.01.2011, указано: Стандартным методом лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции служит определение антител/антигенов к ВИЧ с помощью ИФА. Для подтверждения результатов в отношении ВИЧ применяются подтверждающие тесты. Каждое исследование на ВИЧ с применением простых/быстрых тестов должно сопровождаться обязательным параллельным исследованием той же порции крови классическими методами ИФА, ИБ (пункт 4.8.2.).

Выдача заключения о наличии или отсутствии ВИЧ-инфекции только по результатам простого/быстрого теста не допускается. Результаты простых/быстрых тестов используются только для своевременного принятия решений в экстренных ситуациях (пункт 4.9.).

ИФА тест-системы ИммуноКомб, производства Orgenics Ltd. (Израиль) зарегистрированы Росздравнадзором (регистрационное удостоверение №ФСЗ 2007/00768 от 17.12.07) и разрешены к применению на территории Российской Федерации. Согласно регистрационной документации КРД №47282 от 08.11.2007 года ИФА тест-системы ИммуноКомб позволяют проводить полноценный иммуноферментный анализ, поэтому повтора каждого исследования не требуют. Результаты анализа могут учитываться как визуально, так и с помощью прибора КомбСкан.

При исследовании на ВИЧ с применением простых/быстрых иммунохроматографических (ИХА) тестов для параллельного исследования той же порции крови классическими методами ИФА, ИБ можно использовать тест-системы ИммуноКомб.