

## Зміст

Скорочення використані в тексті посібника	3
Вступ	4
Короткі відомості про епідеміологію, етіологію та патогенез ВІЛ-інфекції	5
Сучасні методи лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції	15
DIA-HIV 1/2	24
DIA-HIV p24	32
DIA-HIV Ag/Ab	37
Обговорення результатів ІФА	41
Література	49

ДП Науково-технічний центр імунобіотехнології  
НТК „Інститут монокристалів” НАНУ  
Київський науково-дослідний інститут епідеміології та  
інфекційних хвороб ім. Л.В.Громашевського АМН  
АТЗТ НВК «Діапроф-Мед»

## СЕРОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА ВІЛ-ІНФЕКЦІЇ

### Практичний посібник

Київ – 2004

УДК 616.98:578.826.6

**Серологічна діагностика ВІЛ-інфекції  
Практичний посібник**

Під редакцією доктора медичних наук,  
професора А.Л.Гураля

Автори: Гураль А.Л., Іванська Н.В., Кислих О.М.,  
Максименко О.В., Раєвська Г.Є., Михайленко Л.П., Шеховцов  
В.О., Мезецька Т.І.

Для лікарів-лаборантів, лікарів інфекційних і загально-  
терапевтичного профілю, епідеміологів, вірусологів, імунологів,  
біологів, студентів вищих учбових закладів та аспірантів

Київ, «Діапроф-Мед», 2004

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 дослідженні інфіцированності вірусом імунодефіцита людини. Семинар под егідою Європейського бюро Всесвітньої організації здравоохранення. - Санкт-Петербург. -1993. - 39 С.С.

33. Thorstensson 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 особо опасных фило-(Эбола, Марбург) и арена-(Ласса, Мачupo) 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

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.
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 вирусом 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. - P. 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. -

Перелік скорочень, використаних у тексті даного посібника.

- АТЗТ – акціонерне товариство закритого типу;  
 ВІЛ – вірус імунодефіциту людини;  
 ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я;  
 ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;  
 ІБ – імунний блот, імуноблот;  
 ІФА – імуноферментний аналіз;  
 МОЗ – Міністерство охорони здоров'я;  
 НВК – науково-виробнича компанія;  
 ОФД – ортофенілендіамін (o-фенілендіамін);  
 ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;  
 РНК – рибонуклеїнова кислота;  
 СНІД – синдром набутого імунодефіциту (людини);  
 ЮНЕЙДС (United Nations AIDS Program) – об'єднана програма Організації Об'єднаних Націй з проблем ВІЛ/СНІДу;  
 ХІПР – хибно-позитивні результати;  
 CDC (USA Centers for Disease Control and Prevention) – Центри США з проблем контролю та попередження захворювань;  
 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) – твердофазний імуноферментний аналіз;  
 LTR (long terminal repeat) - довгі кінцеві повтори;  
 TMB – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин;  
 USA FDA (USA Federal Drug Administration) – Федеральне управління США з питань лікарських препаратів;  
 WB (Western Blot) – імунний блот, імуноблот.

## Вступ

Людство вступило в нове тисячоліття з численними проблемами, які доводиться вирішувати без зволікань; до таких проблем належать, зокрема, інфекційні хвороби. Успіхи, досягнуті у профілактиці та лікуванні цих захворювань в XX столітті, якийсь час давали підстави припускати, що найважливіші проблеми інфекційності спромоглися успішно розв'язати. Однак нова хвиля вже нібито переможених недуг і особливо поява інфекції, викликані вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ) на початку 1980-х рр., докорінно змінила ці уявлення. Сьогодні зрозуміло, що "хвороба століття" становить загрозу не тільки здоров'ю окремої людини, але й виживанню всього людства [1].

ВІЛ-інфекція стала однією з найважливіших та найактуальніших медико-соціальних проблем нашої країни. Боротьба з ВІЛ-інфекцією та синдромом набутого імунного дефіциту (СНІД) в Україні давно вже отримала статус загальнодержавної пріоритетної програми. Починаючи з 1987 р., увагу Міністерства охорони здоров'я (МОЗ) нашої країни звернено на максимальне виявлення ВІЛ-інфікованих та хворих на СНІД осіб як серед громадян України, так і серед іноземних громадян, що прибули у нашу країну; це особливо стосується певних прошарків населення, що належать до груп підвищеного ризику інфікування. Опрацьовано систему епідеміологічного нагляду за ВІЛ-інфекцією, організовано мережу діагностичних лабораторій, кабінетів довіри, обласних та міських центрів профілактики та боротьби зі СНІДом. Неодноразово створювались та вдосконалювались директивно-методичні документи. Верховна Рада України прийняла закон "Про запобігання захворювання на СНІД та соціальний захист населення".

Проте поширення ВІЛ-інфекції/СНІДу триває. Тому не зникає потреба в діагностичних засобах та методах виявлення ВІЛ-інфекції. Лабораторна діагностика ВІЛ-інфекції – це один з найважливіших та найдосконаліших елементів Всесвітньої програми боротьби зі СНІДом, опрацьованої ВООЗ (Global

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, 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., Максименко О.В., Сергеева Т.А., Раєвська Г.Є., Пилипенко В.Г. Практичний посібник з імуноферментного аналізу. – Київ, 2003. – 47 с.
18. Самуїлов В.Д. Имуноферментный анализ. – Соросовский образовательный 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.

## ЛІТЕРАТУРА

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, 4th 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., Мацевич 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 різнообразия 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.

programme on AIDS, WHO, Geneva). Стандарт, на який ми повинні сьогодні орієнтуватися, - це світовий рівень діагностичних досліджень [2].

Щороку в нашій країні має проводитись біля 4 млн. досліджень на ВІЛ-інфекцію, включаючи обстеження 2 млн. донорів та біля 1,5-2 млн. осіб за клінічними та епідеміологічними показниками; це, зокрема, стосується певних груп населення в багатьох регіонах України. Основні потреби клініко-діагностичних лабораторій в Україні забезпечуються тест-системами виробництва АТЗТ НВК «Діапроф-Мед», призначеними для виявлення антитіл проти ВІЛ у сироватках крові. Нижче ми детально опишемо особливості роботи з цими тест-системами, попередньо коротко спинившись на питаннях епідеміології, етіології, патогенезу та загальних проблемах діагностики ВІЛ-інфекції.

### Короткі відомості про епідеміологію, етіологію та патогенез ВІЛ-інфекції

Міжнародні організації ВООЗ та ЮНЕЙДС характеризують ситуацію з ВІЛ-інфекції/СНІДу в світі як пандемію, що охопила всі країни й континенти та призвела до катастрофічних наслідків і вкрай несприятливих демографічних змін у всіх країнах, особливо африканських. Кількість ВІЛ-інфікованих в світі досягла 60 млн. осіб, з них близько 25 млн. померли від СНІДу. Щороку у світі додатково виявляють 5 млн., ВІЛ-інфікованих, а більш як 2 млн. осіб гине від СНІДу [1].

Поширення ВІЛ-інфекції/СНІДу не обійшло й Україну, яка на сьогодні за темпами розвитку епідемії разом з Російською Федерацією посідає одне з провідних місць серед країн Східної Європи. За даними сероепідеміологічного моніторингу, поширення ВІЛ-інфекції в Україні не зменшується; станом на 01.07.2004 р. виявлено 122.026 ВІЛ-позитивних осіб, з яких принаймні дві третини належать до ін'єкційних наркоманів, а 80 % - це особи у віці 20-39 років; постійно виявляють ВІЛ-

інфікованих підлітків. Загальне число ВІЛ-інфікованих складає біля 1 % населення у віці 15-49 років.

Сьогодні у поширенні епидемії ВІЛ-інфекції/СНІДу в Україні найбільшу роль відіграє парентеральний шлях передачі збудника (введення наркотиків забрудненими шприцями). Ін'єкційні наркомани далі поширюють захворювання серед своїх статевих партнерів. Після 1995 р. все більше зростає значення статевого шляху передачі інфекції. Поширюється передача ВІЛ від представників груп ризику до інших осіб, збільшується число ВІЛ-інфікованих жінок. і зростає можливість інфікування дитини від матері. [3]. Разом з тим, широке впровадження сучасних методів діагностики та профілактики дозволило зменшити число випадків передачі ВІЛ від матерів до дитини.

ВІЛ/СНІД належить до вірусних захворювань; його збудник – один з численних представників родини ретровірусів. На сьогодні розрізняють два основних типи вірусу – ВІЛ-1 та ВІЛ-2, дещо відмінних за своєю структурою та антигенними властивостями, а також перебігом викликаної хвороби. Найбільше здоров'ю людини загрожує тип ВІЛ-1.

Встановлено, що ВІЛ належить до родини ретровірусів (Retroviridae) та підродини так званих "повільних вірусів" (Lentivirinae). Для ВІЛ характерні численні структурні особливості цих збудників, дуже досконалий апарат генетичного паразитизму та надзвичайно складна регуляція репродуктивного циклу (рис. 1) [4].

Віріон сферичної форми, діаметр його 100-150 нм. Зовнішня оболонка вірусу складається з шару ліпідів клітинної мембрани, тобто вона хазяйського походження. В цю мембрану вбудовано рецепторні структури (шипи) схожі на гриб. "Шалочку гриба" утворюють молекули глікопротеїну gp120, спорідненого з клітинними рецепторними молекулами CD4. "Ніжка гриба" складається з чотирьох молекул глікопротеїну gp41, вбудованих у мембрану. Під зовнішньою оболонкою розташовується серцевина вірусу (core) у формі конусу, утворена білком p24. Білок p24 слабо взаємодіє з іншими білками вірусних часточок, а тому під дією неіонних детергентів

наявність антитіл до ВІЛ методом імуного блоту, відповідно до рекомендацій експертів ВООЗ та чинної "Інструкції з організації роботи лабораторій діагностики ВІЛ-інфекції", для встановлення діагнозу "ВІЛ-інфекція" (лабораторно) дозволяється застосовувати 3 різні імуноферментні тест-системи.

Скринінговим обстеженням на ВІЛ в Україні на сьогоднішній день підлягають громадяни, визначені Законом України "Про запобігання захворювання на СНІД та соціальний захист населення" (1991), доповненнями до цього Закону (1998), "Правилами медичного огляду з метою виявлення ВІЛ-інфекції, обліку ВІЛ-інфікованих і хворих на СНІД та медичного нагляду за ними".

Тільки на підставі комплексного обстеження пацієнта, що включає збір епідеміологічного і клінічного анамнезу, лікар може зробити висновок про наявність ВІЛ-інфекції й усвідомлення цього є дуже важливим для спеціалістів лабораторної служби. При цьому необхідно мати на увазі, що різні діагностичні методи доцільно використовувати в комплексі, а не надмірно захоплюватися одними на шкodu інших.

З наведених даних витікає, що результати ІФА можуть бути надзвичайно корисним допоміжним засобом при постановці діагнозу, але клініцист повинен брати до уваги багато інших обставин, крім даних лабораторного аналізу. Лише всебічне обстеження хворого та увага до всіх даних анамнезу дозволяє коректно поставити діагноз та розпочати правильне лікування.

донорської крові, її продуктів, тканин, органів, сперми, яйцеклітин), діагностики ВІЛ-інфекції та епідеміологічного нагляду. Ці стратегії визначають певний порядок проведення та спадкоємність первинних та підтверджуючих (верифікаційних) досліджень при тестуванні різних груп населення в залежності від мети обстеження та рівня розповсюдження ВІЛ-інфекції без застосування ІБ. Підтвердити наявність антитіл до ВІЛ в первинно-позитивному зразку сироватки можливо шляхом застосування комбінації імуноферментних тест-систем. Для виключення ХІР, тест-системи, що використовуються для підтверджувальних досліджень, повинні відрізнятися від скринінгових тест-систем антигенами ВІЛ, нанесеними на тверду фазу (дно лунки мікропланшету або полістиролової кульки) та/або форматом досліджень (планшетний або кульковий), та/або принципом дії діагностичному (прямий, непрямої, сандвіч, конкурентний ІФА). Вартість підтверджувальних досліджень за допомогою комбінації імуноферментних тест-систем значно менша, ніж при використанні методу імуноного блоту.

В Україні, відповідно до чинної "Інструкції з організації роботи лабораторій діагностики ВІЛ-інфекції" (Наказ МОЗ України № 71 від 22.02.02 р.), підтверджувальні дослідження на наявність антитіл до ВІЛ відбуваються в два етапи. На першому етапі первинно-позитивний зразок сироватки для виключення ХІР скринінгового дослідження аналізують за допомогою 2-х різних тест-систем з різними антигенами та/або різного формату і принципу дії. Позитивний результат в обох тест-системах свідчить про наявність антитіл до ВІЛ в досліджуваному зразку. На другому етапі підтверджувальних досліджень встановлюють діагноз "ВІЛ-інфекція" (лабораторно) особі, яка має довідку про наявність антитіл до ВІЛ для встановлення її на облік у відповідній медичній установі. На цьому етапі підтверджувальних досліджень зразок сироватки аналізують за допомогою методу імуноного блоту. Цей метод застосовують також при обстеженні осіб з невизначеними результатами тестування, дітей, народжених ВІЛ-інфікованими матерями та в деяких інших випадках. За відсутності можливості підтвердити

на віріони значна частина білку р24 опиняється у розчині. Білок р24 виявляють вже на ранніх стадіях розвитку інфекції в ураженому організмі. Відстань поміж зовнішньою вірусною мембраною та серцевиною заповнено матриксним білком р17.

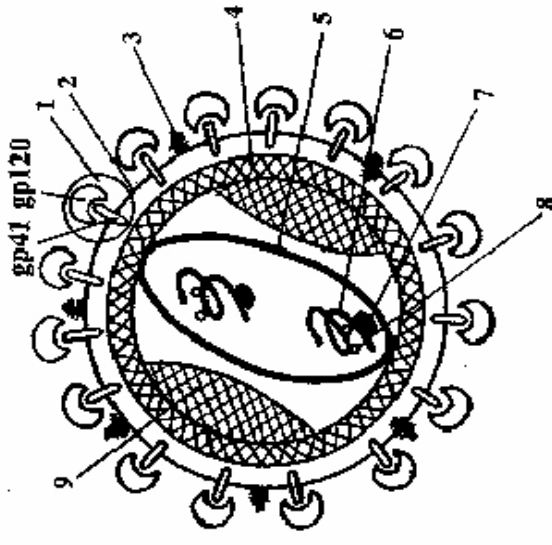


Рис. 1 Схема будови вірусу імунодефіциту людини [4]:

- 1- зовнішній відросток оболонки ВІЛ (gp120, gp41);
- 2- мембрана віріону (клітинного походження);
- 3 – матриксні білки (HLA та ін.);
- 4 – оболонкові білки (р17);
- 5 – оболонка нуклеоїда (р24);
- 6 – генома РНК (дві одноланцюгові молекули);
- 7 – ферменти комплексу інтеграції;
- 8 – нуклеопротеїни; 9 – латеральні тілця.

Усердині серцевини лежать дві тожданні молекули вірусної РНК, структурованих низькомолекулярними білками – р9 та р7. Кожна молекула РНК несе 9 генів ВІЛ. Три з них – gag, env і pol – кодують структурні віріонні білки. Існує три регуляторних гени: tat, rev, pif, а також три додаткових гени: vif, vpr, vif. Ці гени містять інформацію з синтезу білків,

необхідних для розмноження та виживання вірусу. Кінці кожної молекули РНК несуть послідовність, названу довгим кінцевим повтором (long terminal repeat, LTR). Ділянки LTR діють як перемикачі для керування процесом вірусної транскрипції; вони взаємодіють і з білками ВІЛ, і з білками клітин хазяїна.

Крім молекул РНК, в серцевині віріонів міститься декілька молекул ревертази, кодованої геном *pol* (цей фермент складається з двох субодиниць – *p64* та *p53*), ендонуклеази (інтегрази) *p31* та протеази *p22*. Всі ці білки необхідні для того, щоб розпочалася інфекція та щоб забезпечити ранні її етапи. Зворотна транскриптаза (ревертаза) здійснює синтез вірусної ДНК з матриці віріонної РНК. Ендонуклеаза вбудовує вірусну ДНК у геном клітини-хазяїна, внаслідок чого утворюється провірус. Протеаза бере участь у "нарізуванні" попередників вірусних білків при дозріванні нової вірусної часточки.

Віріонна РНК, пов'язана з білками нуклеокапсида, розташовується у нуклеоїді не точно по центру, а дещо зміщено, "ексцентрично". У серцевині зрілих вірусних часточок міститься також регуляторний білок *vif* (продукт однойменного гена), що є трансактиватором процесу реплікації РНК з вірусних генів на початку нового циклу реплікації, до того як у зараженій клітині встигає синтезуватися інший вірусоспецифічний трансактиватор – білок *tat*. В інфікованих клітинах знаходять все більше регуляторних білків - *vif*, *nef*, *rev*, *vri* чи *vrx*, які не входять до складу віріонів; це так звані неструктурні вірусні білки, що регулюють репродукцію ВІЛ.

Як і всі віруси, ВІЛ може розмножуватися тільки в хазяйських клітинах, причому здатен проникати лише в такі клітини, які мають на поверхні певні відповідні рецептори (наприклад, CD4, CXCR-4, CCR-5). Проникнення вірусу в клітину відбувається після приєднання його до клітинної поверхні; при проникненні відбувається "роздягання" вірусної частки і вихід молекул РНК в цитоплазму. Тут проходить перший етап життєвого циклу ВІЛ – зворотна транскрипція, тобто синтез дволанцюгової ДНК на матриці віріонної РНК за участю ферменту ревертази. Утворена провірусна ДНК проникає в ядро клітини, де за допомогою іншого ферменту - інтегрази -

проти IgG; при цьому не береться до уваги наявність у крові специфічних IgM та IgA [2,10,11,30].

Згідно з настановами ВООЗ, пропоновані діагностичні системи повинні попередньо оцінюватися саме в умовах роботи даної клінічної лабораторії, у тих умовах та в тих країнах (регіонах), де їх мають намір широко застосовувати. Не зважаючи на бездоганну репутацію добре відомої фірми-виробника, при виборі діагностичної тест-системи не слід цілковито покладатися ні на відомості, отримані від фірми, ні на результати досліджень, які проводилися й проводяться на цих діагностичних лабораторіях. Результати, отримані в даній лабораторії при проведенні аналізів, можуть істотно залежати від місцевих умов (контингенту обстежуваних осіб, методів отримання та зберігання сироваток, якості води, температури довкілля тощо). Діагностичні тест-системи слід попередньо перевіряти в лабораторії, де ними користуватимуться, і на зразках сироваток, отриманих саме від того контингенту обстежуваних осіб, з яким надалі працюватимуть.

Загалом, перспективи підвищення ефективності боротьби з ВІЛ-інфекцією в значній мірі пов'язані з впровадженням сучасних методів серологічної діагностики - визначенням специфічних антитіл за допомогою імуноферментного аналізу. Серологічні обстеження на наявність антитіл до ВІЛ здійснюються в межах скринінгових досліджень і визначають рівень розповсюдження ВІЛ-інфекції, служать показником інфікованості серед окремих контингентів обстежуваних осіб. Скринінгові дослідження носять багатоетапний характер (первинні та підтверджуючі) і спрямовані не тільки на виявлення захворювання та його поширення, але й на більш поглиблене обстеження з метою уточнення діагнозу і прийняття рішення про необхідне медичне втручання.

На сьогодні існує декілька методичних підходів до проведення скринінгових досліджень на ВІЛ. У відповідності з рекомендаціями ВООЗ (1997), обстеження проводять з метою забезпечення трансфузійних/трансплантаційних заходів (безпека



чинників, які призводять до отримання хибно-позитивних результатів при дослідженні серологічними методами, з ІФА включно. Що з більшим числом чужих антигенів та збудників контактує обстежувана особа, то більша ймовірність отримати хибно-позитивний результат. Створюється враження, що ХІП зустрічаються при численних ситуаціях, причетних до поліклональної активації В-лімфоцитів, коли незалежно від фактора, який викликав таку активацію, синтезується багато видів антитіл<sup>2</sup>.

Інші можливі причини – прогрівання досліджуваних сироваток, наявність у сироватках антитіл проти вуглеводів, випадки пасивної імунізації (це особливо стосується препаратів антитіл, виготовлених до 1985 р.), високі рівні антитіл та імунних комплексів, що циркулюють у крові, високому вмісті ліпідів та білірубину у досліджуваних сироватках, постановці реакції з гемолізованими сироватками.

Слід сказати також і про можливі хибно-негативні результати тестування. Чи не найважливіша причина їх – недостатня чутливість тест-системи та відсутність на твердій фазі саме тих антигенів, проти яких у даному випадку виникли антитіла. Можливе носійство збудника без клінічних проявів хвороби та без синтезу антитіл. Не виключено негативний результат дослідження у випадках, коли проби крові беруть у період так званого сероконверсійного "вікна", коли в зараженому організмі ще немає специфічних антитіл, а також в термінальній стадії деяких хвороб при тяжкому враженні імунної системи з глибокими порушеннями гуморальної імунної відповіді. Ще одна причина хибно-негативних результатів, ймовірно, може полягати в недостатній специфічності застосованого кон'югату антитіл з ферментом, оскільки в більшості діагностичних систем використовують кон'югат

вбудовується в одну з хромосом хазайської клітини. Після вбудовування провірусної ДНК в хромосому ДНК клітина довіку стає носієм генетичної інформації ВІЛ; коли клітина поділиться, всі її нащадки також міститимуть повну генетичну інформацію, необхідну для розмноження ВІЛ [5,6].

Подальший етап життєвого циклу ВІЛ відбувається в ядрі клітини: під дією клітинних ферментів, РНК-полімераза, синтезується РНК на матриці провірусної ДНК ВІЛ. Синтезовані компоненти ВІЛ – віріонні РНК та білки – складаються у вірусні часточки на плазматичній мембрані. Після "запаковування" рибонуклеопротеїну незрілий віріон відривається від поверхні клітини, захоплюючи частину мембрани з клітинними білками та ліпідами [7].

В одній інфікованій клітині може утворюватися кілька сотень нових віріонів. Як вважають дослідники, всі ретровіруси, серед них і ВІЛ, проходять три функціональних стани після завершення вірусоспецифічних синтезів у клітині: самоскладання, дозрівання та старіння [7].

Спроможність ізолятів ВІЛ інфікувати різні типи клітин дуже неоднакова. Розрізняють моноцито/макрофаготропні (М-тропні) та Т-тропні ізоляти. У ході розвитку ВІЛ-інфекції М-тропні штами ВІЛ, які переважають на початку хвороби, замінюються штамами з двоїстим тропізмом, а потім остаточно витісняються Т-тропними штамами, які домінують на фінальних стадіях захворювання на СНІД [8,9].

Основна ознака ВІЛ-інфекції – імунний дефіцит з численними порушеннями, яких не було встановлено при народженні та успадковано від батьків і які розвинулися лише під дією занесеного із зовні інфекційного чинника у осіб без будь-яких ознак первинного імунного дефіциту.

В основі всіх патологічних процесів, які відбуваються при ВІЛ-інфекції, лежить експресія вірусних генів. Певні вірусні білки (наприклад, продукт гену tat), експресуючись у клітинах CD4<sup>+</sup>, понижують здатність цих клітин відповідати на антигени і, отже, у такий спосіб обумовлюють імунний дефіцит. Дослідники вказують на пряму цитопатичну та нецитопатичну дію ВІЛ, включаючи активацію Т-клітин та ВІЛ-специфічну

<sup>2</sup> Наприклад, при вакцинаціях проти гепатиту В, грипу, тощо; при різних інфекціях, зокрема, дихальних шляхів (наприклад, викликаних вірусом Епштейна-Барр, вірусами простого герпесу).

імунову відповідь (гуморальний та клітинний імунітет), аутоімунні механізми, вплив суперантигенів та апоптоз [10,11].

До кінця незрозуміло, наскільки стійкість проти ВІЛ обумовлена наявністю антитіл. У більшості випадків у ході ВІЛ-інфекції утворюються антитіла проти оболонкових та інших вірусних білків. Падіння рівня сироваткових антитіл проти білків *gag* супроводжується, як правило, прогресуванням хвороби. Однак вірус нейтралізують саме антитіла, направлені проти білків *env*. Постає питання про те, чому ж вірусні часточки уникають нейтралізації та чому антитіла не дають надійного захисту проти ВІЛ. Однією з переконливих відповідей на це запитання може бути дуже швидкий темп величезної мінливості ВІЛ, за яким не встигає вкрай виснажена імунна система інфікованого організму [11].

Величезна мінливість ВІЛ та все розмаїття патологічних змін, які викликають вірусні квазивиди в культивованих клітинах та в організмі, призводять до великої різноманітності клінічних проявів хвороби в залежності від особливостей вірусу-збудника, особливостей зараженого організму та від етапу розвитку хвороби. У ході ВІЛ-інфекції в організмі заражаються мільйони клітин, відбуваються нескінченні інфекційні цикли, що супроводяться помірним чи значним виходом віріонів з іще життєздатних клітин, а часом і загибеллю вражених клітин [9,12.13].

Основною причиною, що обумовлює дуже високу мінливість ВІЛ, як і мінливість деяких інших відомих ретровірусів, є відсутність у їх геномах механізмів корекції. Через це при функціонуванні вірусних ферментів (ендонуклеази, зворотної транскриптази) виникає велика кількість помилок, які призводять до виникнення мутацій. У життєвому циклі ВІЛ є принаймні три стадії, на яких можуть відбуватися точкові мутації: зворотне зчитування інформації з геномної РНК на мінус-ланцюжок ДНК, синтез на ньому плюс-ланцюжка ДНК при утворенні провірусу і, нарешті, транскрипція РНК. За наявними підрахунками, у геномі ВІЛ за один цикл реплікації виникає 8-10 мутацій; при цьому підраховано, що частота мутацій у геномі ВІЛ-1 на один нуклеотид становить  $3 \times 10^5$  [14].

на ранній її стадії, але й на наявність іншого, нерозпізаного ще ретровірусу, який зберіг (чи набув) спорідненість з ВІЛ у ході еволюційного розвитку. Така позитивна реакція може фіксуватися через наявність у ретровірусів певних областей з порівняно малою мінливістю генома (при величезній мінливості ретровірусних геномів в цілому). Як відомо, ретровіруси причетні до виникнення багатьох неопластичних процесів та пухлин; частина вірусного генома буває при цьому присутня у трансформованій клітині (інтегрована в її геном). В результаті в такій клітині можуть експресуватися та цією клітиною секретуватися білки, кодовані певними ретровірусними послідовностями, на які організм відповідає синтезом антитіл. Подібні випадки описано при можливих бородавках, можливих міеломах, злоякісних захворюваннях крові та лімфи; позитивну реакцію з серцевинними білками ВІЛ-1 дають 24 % хворих з підшкірною Т-клітинною лімфомою, лімфопроліферативними хворобами.

Крім того, поява в організмі ВІЛ-подібних білків та синтез антитіл проти них відбувається при станах, пов'язаних з аутоімунними проявами, наприклад, при вагітності (особливо багатоплідній), при системному червоному вовчаку, склеродермі, численних захворюваннях сполучної тканини, дерматоміозиті, хронічному поліартриті, викликаному синдромом Шегрена, розсіяному склерозі (коли знаходять антитіла проти ВІЛ-1, ВІЛ-2 та іншого людського ретровірусу, HTLV-1), при наявності ревматоїдного фактора, та з аутоімунними реакціями при недугах, що первинно нібито не мають аутоімунного характеру (проказа, коли синтезуються аутоантитіла проти колагену, малярія, лейшманіоз, туберкульоз, різноманітні інфекційні гепатити<sup>1</sup> та алкогольний гепатит, ослаблена робота нирок та призначений через неї гемодіаліз). Так, за зведеними даними, існує біля 70 хвороб або інших

<sup>1</sup> Наприклад, гепатит А, гепатит В, гепатит С та пошкодження печінки, пов'язане з Q-лихоманкою, викликаною *Rickettsia burneti*.

мімікрія полягає у подібності лінійної послідовності амінокислот чи залежить від конформаційної подібності, дуже вірогідна навіть коли йдеться про структури зовсім різного походження, наприклад, про антигенні детермінанти вірусу та хазяїна. Перехресну реактивність такого типу поміж антитілами проти різних білків встановили у дослідках з гуморального та клітинного імунною відповіддю. Комп'ютерні порівняння теж довели мімікрію поміж вірусними та хазяйськими білками. Ці дані сукупно з даними про послідовності білків (пептидів), пов'язаних, за результатами рентгеноструктурного аналізу, з білками основного комплексу гітосомісності (МНС) класів I та II, підтверджують таку гіпотезу. Наприклад, спостерігається молекулярна мімікрія поміж трансальдозою людини, яка селективно експресується в олігодендроцитах, та білками gag T-клітинного лімфотропного вірусу людини – ВІЛ-1[34].

Отже, деякі випадки ХІПР при діагностиці ВІЛ-інфекції можна пояснити, виходячи з антигенної мімікрії. ХІПР може виникати через присутність у тестованих сироватках якихось інших “природних антитіл” проти невідомих антигенів; звідси погано зрозумілі у багатьох випадках перехресні реагування. Подекуди, правда, причина таких результатів цілковито з'ясована, бо у ряді випадків достеменно доведено наявність антигенної мімікрії. Так, зрозумілі витоки появи ХІПР при визначенні антитіл проти ВІЛ у осіб, хворих на шистозоматоз, оскільки виявлено тотожні епітопи у дуже віддалених представників живого світу – гельмінта *Schistosoma mansoni*, поширеного у країнах з жарким кліматом, та ВІЛ-1. Ідентифіковано спільний для обох видів В-епітоп, що складається з 14 амінокислот. Моноклональні антитіла проти цього епітопа реагують і з поверхневим антигеном *Sch.mansoni*, і з ВІЛ-1 (з його регуляторним білком *vif*) [35].

Є також немало випадків присутності у сироватках крові антитіл проти споріднених вірусів. Наприклад, ХІПР при визначенні антитіл проти ВІЛ можна отримати при наявності в організмі деяких інших ретровірусів. Позитивна реакція з серцевинними білками ВІЛ при перевірці даних ІФА у імуноблоті може вказувати не лише на присутність ВІЛ-інфекції

Як сьогодні вже доведено при детальному аналізі нуклеотидних послідовностей багатьох ізолятів, ВІЛ-1 та ВІЛ-2 теж виникли завдяки мінливості своїх пралопередників – інфекційних агентів, що викликають імунодефіцит у шимпанзе та у нижчих мавп – мангабеїв і мандрилів. ВІЛ-1 походить від шимпанзе, тобто від  $SIV_{Crz}$ , а ВІЛ-2, менш вірулентний щодо розвитку спричинюваної хвороби – від нижчих мавп. Вважають, що штами ВІЛ-1 вперше потрапили до людських популяцій десь у 1920-1930 роках. Три окремих групи ВІЛ-1 – О, М та N – виникли від трьох початкових штамів  $SIV_{Crz}$ , кожен з яких незалежно інфікував людину. До групи О (outlier, тобто "сторонніх", "осібних", "віддалених") входять штами ВІЛ-1, які дивергентно віддалені від основної маси філогенетично споріднених штамів з групи М (major group, основної групи), до якої віднесено на сьогодні 10 субтипів (генотипів/серотипів А-J). Повніший молекулярно-епідеміологічний та серологічний аналіз дозволяє встановити, наскільки широко представлені дані гено- та серотипи у певних районах; у багатьох випадках чітко виявлено географічні кластери (скупчення) певних серотипів. Наприклад, до 1993 р. всі досліджені ізоляти Північної Америки та Європи належали до серотипу В, який знайшли також і в Бразилії, Таїланді, Єгипті та Уганді. У ряді країн Східної Європи виявлено ізоляти субтипів F, G, H та I, а в США – донедавна невідомі ізоляти субтипів A, D та E; є подібні ж дані щодо ряду західноєвропейських країн, де переважає субтип А. За нашими даними, в Україні сьогодні поширені, головним чином, субтипи А і С. Крім того, ізоляти субтипу С виявляють переважно на півдні та на сході Африки та на західному узбережжі Індії, що узгоджується з даними про подібність штамів зі сходу Африки та індійських штамів [15,16].

Деякі наявні літературні дані свідчать про певний взаємозв'язок поміж характером розвитку вірусної інфекції ("мірою її злоякісності") та серотипом ВІЛ-1. Встановлено взагалі близьку кореляцію поміж фенотипом ВІЛ-1 (а вірулентність вірусу є одним з маркерів його фено типу) та молекулярною структурою третього варіабельного домену (петлі V3, або так званої V3-loop) [15,16]. Наприклад, показано,

що при враженні вірусом серотипу С, D чи G хвороба прогресує значно повільніше, ніж при інфікуванні вірусом, який належить до серотипів А чи Е. Існує думка про зв'язок серотипу зі здатністю ВІЛ-1 розпізнавати певні рецептори на певних типах клітин у інфікованому організмі. Вірусні штами, які не викликають виникнення синцитіїв, менш активні, менш заразні, ніж штами, що призводять до злиття інфікованих клітин. Поява вірусних ізолятів, що викликають утворення синцитіїв після інфікування субтипом В, свідчить про те, що хвороба підійшла до кінцевої стадії. При зараженні ВІЛ-1 субтипу Е виявлено появу синцитіїв на ранній, ще доклінічній стадії інфекції. Для субтипу С не описано варіантів, що викликають виникнення синцитіїв. Однак деякі авторитетні клініцисти взагалі заперечують якийсь очевидний, добре помітний взаємозв'язок між серотипом вірусу, яким інфіковано хворого, та клінічними проявами хвороби, хоча є вказівка на існування дефектних штамів, що ніби-то не викликають розвитку хвороби [9].

Клінічна стадія інфекції повністю проявляється від того моменту, як починається невпинна та прискорена втрата Т-лімфоцитів CD4<sup>+</sup>. Таку втрагу вважають одним з провідних факторів виникнення СНІД після ВІЛ-інфікування. Дослідження природного перебігу ВІЛ-інфекції у людини виявили дуже широкий діапазон її клінічних проявів – від прихованих, безсимптомних станів до захворювання, яке одночасно загрожує здоров'ю та життю хворого і характеризується надзвичайно низьким вмістом Т-лімфоцитів CD4<sup>+</sup>, тяжким імунodefіцитом і, як наслідок – розвитком численних і різноманітних опортуністичних інфекцій та злоякісних захворювань [3,9,10,11].

Слід зазначити, що всі теперішні класифікації ВІЛ-інфекції/СНІДу потребують подальшого розвитку у зв'язку з деякими успіхами антиретровірусної терапії. Доповненням до російської класифікації могло б стати визначення характеру перебігу тієї чи іншої стадії хвороби. У кожній стадії можна виділити фазу наростання (прогресування) хвороби та фазу ремісії. Фаза прогресування характеризується наявністю клінічних проявів хвороби, а фаза ремісії – відсутністю чи

подібністю у дуже віддалених видів. Зараз зрозуміло також, що одне з основних джерел мімікрії з'явилося разом з виникненням «мандрівних» генетичних структур як переносників генетичної інформації поміж соматичними клітинами; йдеться саме про передачу генетичної інформації, не пов'язану з процесом розмноження. Від таких структур виникли віруси, які несли частину інформації, закодованої в геномі хазяїна. З часом багато вірусів набули здатності проникати в інші, чужорідні клітини, багато в чому змінилися, але частково зберегли генетичну спорідненість з клітинами, від яких достатньо далеко відійшли, та з іншими спорідненими вірусами. Крім того, мімікрія може виникати:

- завдяки горизонтальній передачі генетичної інформації (наприклад, через віруси, плазміди чи у ході так званої генетичної трансформації у бактерій);

- при інтеграції чужої генетичної інформації у геном клітина отримує здатність синтезувати нові білки, які, можливо, матимуть антигенну (та іншу) схожість з білками дуже й дуже віддалених видів.

Як відомо, геноми сучасних багатоклітинних організмів містять численні ретровірусні послідовності, причетні до функціонування хазяйського генома. Очевидно, певні області цих послідовностей у геномі людини можуть нагадувати коротші чи довші ділянки у геномах ретровірусів, патогенних для людини. Така думка підтверджується тим, що приблизно 5 % моноклональних антитіл проти 15 очищених препаратів різних вірусів реагують також з хазяйськими антигенними детермінантами [33]. У цих дослідах проаналізували понад 800 МКА проти таких загальновідомих представників ДНК- та РНК-вмісних вірусів, як вірус простого герпесу, цитомегаловірус, вірус Епштейна-Барр, вірус вакцини, міксовіруси, параміксовіруси, аренавіруси, флавівіруси, ортовіруси, рабдовіруси, коронавіруси та ретровіруси людини [34]. Ці результати дали підставу для гіпотези про те, що молекули, кодовані неподібними генами, чи білкові продукти різних генів мають деякі подібні структурні особливості, що дають можливість для певної імітації. Думка про те, що антигенна

- Тривалість аналізу 2,5 години.
- Один набір розраховано на 192 аналізів.
- Різні варіанти комплектації наборів по вибору споживача: стриповий або монолітний планшет, хромоген ТМБ або ОФД.
- Термін придатності 12 місяців

### Обговорення результатів ІФА

Сучасні методи лабораторної діагностики дозволяють достатньо надійно виявляти антитіла до ВІЛ, його антигени, ідентифікувати компоненти вірусу, визначати вірусне навантаження, тощо. Однак мінливість ВІЛ, яка не має аналогів у порівнянні з мінливістю інших відомих вірусів людини, створює деякий ризик одержати хибно-негативні результати дослідження [30]. Цю проблему вдається вирішити завдяки використанню в тест-системах рекомбінантних білків, створених з консервативних ділянок вірусу.

Слід, проте, зауважити, що всі тест-системи компанії «Діапроф-Мед», як і більшість подібних сучасних систем закордонного виробництва, призначених для визначення антитіл проти ВІЛ, показали 100 %-ву чутливість при роботі зі стандартними контрольними зразками. Складніше стоїть справа щодо специфічності визначення антитіл проти ВІЛ та отримуваних хибно-позитивних результатів (ХІПР) досліджень [31].

За зведеними даними ВОЗ, при використанні найкращих діагностикумів для виявлення ВІЛ-інфекції частота ХІПР становить 0,0004-0,0007 % [32].

Однією з причин появи ХІПР може бути так звана антигенна мімікрія. Під антигенною мімікрією розуміють випадки наявності у білків різного походження або дуже подібної, або цілком totoжної первинної амінокислотної послідовності та структури. Така totoжність буває наслідком спільного походження двох чи багатьох структур певного функціонального призначення; деякі з них зберегли різну

послабленням цих проявів. Необхідно також охарактеризувати класифікації ті випадки, коли в результаті успішного лікування настає тривале поліпшення стану хворого. Нині комбінована антиретровірусна терапія, призначена на стадії ЗБ, може на досить довгий час привести хворого до стану безсимптомної інфекції. Тому В.В.Покровський зі співавторами вважають, що до класифікації слід внести також поняття про спонтанну та терапевтичну ремісію. Крім того, вони не визнають доцільності деяких положень Центру контролю захворюваності США (Centers for Disease Control - CDC, Атланта) щодо класифікації ВІЛ-інфекції, хоча стверджують, що сучасна американська класифікація клінічних стадій ВІЛ/СНІД дуже наближається до російської.

Висловлено також думку, що для визначення стадії ВІЛ-інфекції слід використовувати дані про вірусне навантаження – про вміст вірусної РНК в 1 мл плазми крові інфікованої людини; цей показник визначається за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Вірусне навантаження може сягати від декількох копій до  $10^6$ - $10^7$  копій в 1 мл плазми. Воно є одним з найважливіших показників розвитку ВІЛ-інфекції та результативності її лікування, оскільки визначення саме цього показника дає змогу безпосередньо оцінити стан розмноження ВІЛ в інфікованому організмі в даний момент [11].

Звичайно ж, патогенез ВІЛ-інфекції зумовлено особливостями штаму ВІЛ, що викликав інфікування, його мінливістю в організмі та імунною відповіддю хазяїна на інфекцію. Різний вклад цих ключових чинників визначає кінцевий результат ВІЛ-інфекції – довготривале виживання зараженого організму чи прискорений розвиток СНІД з усіма супутніми явищами [9]. Не завжди вдається, як того вимагають методологічні підходи класичної патології, "вирізнити у картині захворювання те, що є в ній результатом ушкодження, а що стає результатом протидії організму у відповідь на це ушкодження. Ці дві категорії явищ часто сплутуються, переплітаються поміж собою". Таке зауваження особливо стосується тих стадій ВІЛ-інфекції, коли до неї через ослаблення організму приєднуються інші збудники інфекційних хвороб.

ВІЛ-інфекція характеризується багаторічним розвитком, і донедавна вважали, що вона завжди закінчується тільки смертю. Однак повідомлення про маловірулентні та дефектні штами ВІЛ і описи затяжних "в'ялих" довгоплинних процесів у деяких ВІЛ-інфікованих з певними генетичними маркерами свідчить про можливість іншого завершення інфекційного процесу. Разом з тим достеменно описано випадки смерті від СНІД вже через сім місяців після інфікування. Раніше випадки швидкого прогресування хвороби пов'язували саме з ізолятами вірусу, які характеризуються прискореним розмноженням у культурі. Проте В.В.Покровський та співавт., проаналізувавши наявні відомості з цього питання, показали, що така кореляція проявляється не завжди і що "від хворих з одного епідемічного ланцюга, заражених генетично однорідним вірусом, можна виділити ізоляти, які відрізняються за досліджуваними маркерами". Загалом вважають, що після зараження людини на розвиток хвороби, на її патогенез впливає ще багато різноманітних чинників; патогенез аж ніяк не обумовлений самим лише штамом ВІЛ, що викликав інфекцію, та вірулентністю даного штаму; постійну детермінанту розвитку патологічного процесу становлять лише генетичні особливості інфікованих. Великий вплив на перебіг ВІЛ-інфекції мають інші супутні патогени (віруси групи герпесу, папонавіруси та інші збудники з властивостями суперантигенів), а також чужорідні антигени та цитокіни, які посилюють імунну активацію (і, отже, здатність ВІЛ розмножуватися у клітинах хазяїна). Додаткове пригнічення імунної системи через несприятливий вплив інших інфекцій, терапевтичних препаратів і токсинів теж вносить вагомий вклад у розвиток хвороби [9,11].

Загалом вивчення патогенезу ВІЛ-інфекції на клітинному рівні та на рівні цілого організму вже дало певні позитивні наслідки з точки зору клініцистів. Розуміння механізмів репродукції вірусу та його взаємодії з клітинами дало змогу звернутися до терапії ВІЛ-інфекції за допомогою сполук, які гальмують активність зворотної транскриптази, транскрипцію РНК з провірусної ДНК та синтез вірусних білків.

(Advanced Biotechnologies, США) склала 70 пг/мл. Окрім панелей сироваток для детальної оцінки чутливості тест-системи на сироватках крові ВІЛ-інфікованих громадян України було протестовано 80 зразків крові ВІЛ-інфікованих осіб на стадії ранньої сероконверсії, дані сироватки були надані лабораторією вірусних гепатитів та ВІЛ-інфекції Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського АМН України. Всі протестовані зразки в тест-системі "DIA-HIV-Ag/Ab" були виявлені позитивними.

### Специфічність

При оцінці специфічності тест-системи на стандартній панелі сироваток, що не містять антитіл до ВІЛ (МБС, Росія) хибно-позитивних результатів не виявлено. На 412 зразках сироваток крові донорів та 220 сироватках крові вагітних жінок показник специфічності склав 99,5 %.

### Особливості та переваги тест-системи

- Висока чутливість і специфічність.
- Використання високоочищених і високоспецифічних моноклональних антитіл проти антигену р24 ВІЛ та рекомбінантних білків-аналогів оболонкових антигенів ВІЛ-1 і ВІЛ-2 - env1 (gp120, gp41) та env2 (gp36) в складі імуносорбенту.
- Використання в якості кон'югатів антигенів env1 і env2, мічених пероксидазою, а також поліклональних афіноочищених біотинильованих антитіл до білку р24 і стрептавідину, міченого пероксидазою.
- Одночасна інкубація сироваток з кон'югатами антигенів Env1 і Env2 і біотинильованих антитіл до білку р24 в лунках планшета.
- Відкрита система, що легко адаптується до умов рутинного серологічного тестування.
- Загальноприйнята стандартизація обліку результатів.

## Сучасні методи лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції

### Характеристика показників якості тест-системи

#### «DIA-HIV-Ag/Ab»

#### Чутливість

На сучасному етапі для скринінгових досліджень на ВІЛ-інфекцію найбільш широко застосовуються тест-системи третього покоління, що дозволяють виявляти анти-ВІЛ специфічні антитіла на 21-28-й день з моменту інфікування. Однак цей період може бути скорочено на 4-8 днів при використанні тест-наборів четвертої генерації, які призначені для одночасного виявлення антитіл, специфічних до ВІЛ та корового антигену ВІЛ – р24. Застосування тест-систем такого типу у службі переливання крові безумовно суттєво підвищує безпеку донорської крові у відношенні ВІЛ

Показники інформативності тест-системи четвертого покоління «DIA-HIV-Ag/Ab» оцінювали на стандартних та комерційних панелях, а також на зразках сироваток крові донорів та вагітних. Під час тестування на стандартних панелях сироваток, що містять антитіла до ВІЛ-1 та ВІЛ-2 (МБС, Росія); панелі сироваток, що містять антитіла до ВІЛ-1 в низьких титрах PRB-107 (ВВІ, США); панелі сироваток, що містять антиген р24 в різних титрах PRA203 (ВВІ, США) чутливість тест-системи склала 100 %. Здатність тест-набору «DIA-HIV-Ag/Ab» виявляти ВІЛ-інфекцію на ранніх стадіях інфікування визначали на сероконверсійних панелях PRB 912, PRB927, PRB928 (ВВІ, США). В цих дослідженнях всі зразки панелі PRB 912 були позитивними. На панелях PRB927 та PRB928 не були виявлені позитивними лише перші сироватки, в яких, згідно паспортних даних, відсутні специфічні антитіла, антиген р24 та РНК ВІЛ. Решта сироваток в складі панелей (№ 2-5 PRB927, № 2-5 PRB928) були виявлені позитивними, при чому зі значенням оптичної густини > 2,0 (граничне значення в системі 0,205 оптичних одиниць). Межа чутливості тест-набору щодо виявлення р24 при використанні очищеного нативного антигену р24 HIV<sub>1</sub>ДВ

Розвиток лабораторних методів для виявлення ВІЛ-інфекції розпочався тоді, коли було вже досягнуто визначних успіхів у імуноферментній діагностиці інфекційних та багатьох інших захворювань; відтак, імуноферментний аналіз (ІФА) відразу ж посів чільне місце при діагностуванні ВІЛ-інфекції. У даному посібнику мова піде конкретно про застосування ІФА для виявлення антигенів ВІЛ та антитіл проти них; більш детальні методичні вказівки, які стосуються проведення ІФА, можна знайти у виданому посібнику компанії «Діапроф-Мед» [17].

Матеріалами для серологічних досліджень можуть бути сироватка (плазма) крові, слина, слізна рідина, спинномозкова рідина, сеча, генітальні секрети, тобто всі біологічні рідини організму, але найпридатніший матеріал – це сироватка (плазма) крові.

ІФА нині став найпоширенішим методом діагностики ВІЛ завдяки ряду його безперечних переваг. До них відносять високу чутливість, можливість використання мінімальних об'ємів досліджуваних зразків біологічних рідин, простоту проведення реакції, інструментальний облік отриманих результатів та автоматизацію майже всіх етапів ІФА і, не в останню чергу, відносно низьку вартість діагностичних наборів. Слід зазначити, що хоча існує декілька варіантів ІФА (прямий, непрямий, конкурентний, "сандвіч"), в усіх них використовують кон'югат ферменту зі специфічними антитілами/антигенами та проявник (суміш субстрату з хромогеном), в результаті чого розвивається забарвлення реакційної суміші [17,18].

Більшість тест-систем на основі ІФА для виявлення сумарних антитіл до ВІЛ створено за принципом класичного твердофазного непрямого ІФА (ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Як тверду фазу (імуносорбент) частіше застосовують полістирол з іммобілізованими на його поверхні антигенами - аналогами діагностично важливих (імунодомінантних) білків ВІЛ. Кон'югат, застосовуваний у ІФА

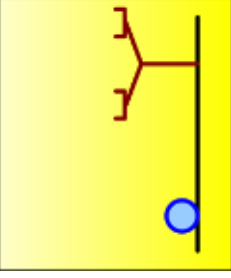
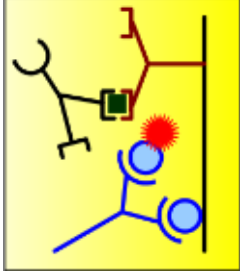
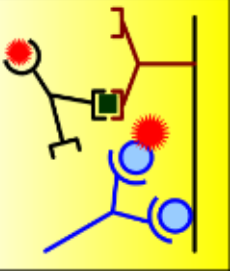
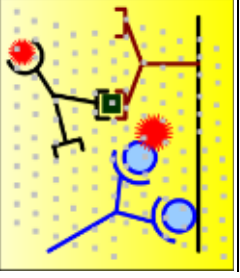
при тестуванні на ВІЛ-інфекцію, – це антитіла до імуноглобулінів людини (антивидові антитіла), синтетичні або рекомбінантні пептиди, мічені ферментом (наприклад, пероксидазо хрому чи лужною фосфатазою). Індикатором для виявлення комплексу антиген-антитіло служить розчин проявника, що містить субстрат та хромоген (наприклад, *o*-фенілєндіамін – ОФД чи тетраметилбензидин – ТМБ при роботі з пероксидазою хрому). Інтенсивність забарвлення реакційної суміші, яку визначають фотометрично (за величиною оптичної густини – *ОГ*), лінійно залежить від наявності та концентрації антитіл до ВІЛ у досліджуваному зразку сироватки (плазми) крові [17,18].

Ранні антитіла до основних внутрішніх білків ВІЛ – р55, р24, р17 (все це продукти гену *gag*) – можна визначати за допомогою ІФА в середньому на 3-6-му тижні інфікування приблизно у 75 % осіб. Найбільш імуногенними (імунодомінантними) вважаються глікопротеїни – продукти гену *env* (gp160, gp120 та gp41), антитіла до яких, як правило, з'являються пізніше та визначаються у 98 % інфікованих осіб. Для ВІЛ-інфекції характерна наявність так званого періоду "сероконверсійного вікна" (його ще називають серонегативним, латентним, інфекційним, діагностичним вікном), коли антитіл до ВІЛ у сироватці крові ще немає або ж кількість їх настільки незначна, що вони не виявляються сучасними імуноферментними тест-системами для визначення антитіл. Як правило, першими з'являються імуноглобуліни класу М до білків, кодovаних геном *gag*; вони циркулюють під час віремії. Через 5-7 днів після появи антитіл класу IgM починають синтезуватися антитіла класу IgG до р24 та gp120. Встановлено, що більш як у 95 % ВІЛ-інфікованих осіб сероконверсія відбувається протягом 5-6 місяців після зараження ВІЛ, а тривалість цього періоду залежить від інфекційної дози, шляху передачі вірусу, деяких інших чинників [19-22].

Коротка, але насичена історія розробки діагностикумів для виявлення антитіл до ВІЛ представлена декількома поколіннями тест-систем, при цьому вдосконалювалися використовувані реактиви, антигени та кон'югати, було

### Схема 3. Проведення ІФА на тест-системі „DIA-HIV-Ag/Ab”

Етапі проведення аналізу

Процедура	Формування комплексу
<p>Полістиролові стрипи, сенсibilізовані рекомбінантними білками і моноклональними антитілами до р24</p> <p>Внесення в лунки по 100 мкл зразків контролів і сироваток та по 50 мкл антитіл детекції з біотином, а також рекомбінантних білків, мічених ПХ. Інкубація протягом 60 хв. при 37 °С (формування комплексів МКА-р24-МКА+біотин та АГ-АГ-АГ+ПХ)</p>	 
<p>Промивання 6 разів буфером. Внесення розчину стрептавідину +ПХ. Інкубація протягом 30 хв. Приєднання стрептавідину до біотину.</p>	
<p>Внесення в лунки по 100 мкл розчину проявника. Інкубація 30 хв. при кімнатній температурі (забарвлення). Зупинення реакції стоп-реагентом. Реєстрація оптичної густини/</p>	



### Принцип аналізу

Основні компоненти набору “DIA-HIV-Ag/Ab” – імуносорбент з сорбованими на ньому моноклональними антитілами проти білку p24 та рекомбінантними антигенами env-1 та env-2.

Кон’югат №1 – суміш кролячих поліклональних афіноочищених біотинільованих антитіл проти білку p24 та очищені рекомбінантні білки env ВІЛ-1 та env ВІЛ-2, мічені пероксидазою (ПХ).

Кон’югат №2 – стрептавідін, кон’югований з пероксидазою.

Під час проведення імуноферментного аналізу досліджувані сироватки інкубують одночасно з пероксидазними кон’югатами рекомбінантних антигенів та біотинільованими антитілами проти білку p24, на другому етапі інкубацію проводять з кон’югатом стрептавідина, міченого пероксидазою хрому. Після з’єднання антитіл з антигенами і утворення комплексів, їх виявляють за допомогою проявника, який в результаті ферментної реакції з субстратом за допомогою хромогену забарлює реакційну суміш.

В якості проявника використовують субстрат - перекис водню та хромоген - тетраметилбензидин. Пероксидазну реакцію зупиняють, додаючи стоп-реагент і вимірюють оптичну густину при 450/620 нм. На схемі 3 показана поетапна послідовність проведення імуноферментної реакції на тест-системі „DIA-HIV-Ag/Ab”.

стандартизовано та автоматизовано проведення реакцій; тепер можна повніше та чіткіше розуміти клінічне значення отриманих результатів.

В діагностикумах першого покоління як антиген використовували інактивовані, а в подальшому – зруйновані та очищені лізати культурального вірусу. При використанні цих наборів отримували відносно високий рівень неспецифічних результатів, як хибно-негативних, так і хибно-позитивних. З одного боку, посилена сорбція окремих вірусних білків на пластике обумовлювала достатньо високу чутливість "лізатних" діагностикумів. Але разом з тим приготування лізату ВІЛ-інфікованих клітин – процес складний і коштує дорого; процедура очищення ВІЛ від баластних речовин важко піддавалася технологізації і впливала на специфічність білки ВІЛ, що призводило до отримання певної кількості хибно-негативних результатів. Крім того, недостатня чистота природного вірусного антигену створювала умови для отримання хибно-позитивних реакцій. Незважаючи на те, що за допомогою тест-систем 1-го покоління можна було виявляти антитіла до ВІЛ у середньому починаючи лише з 55 дня після інфікування, саме з цих діагностикумів почався розвиток серологічної діагностики ВІЛ-інфекції; вони стали початковим інструментом при обстеженні різних груп осіб, насамперед, при обстеженні донорів крові.

Деякі недоліки діагностикумів першого покоління усунули в імуноферментних наборах 2-го покоління, де антигенами служили рекомбінантні та синтетичні поліпептиди-аналоги вірусних білків. Застосування тест-систем 2-го покоління дозволило виявляти антитіла до ВІЛ починаючи вже з 42-го дня після інфікування. Однак ці тести (кон’югатом у яких були антивидові антитіла проти людських імуноглобулінів класу G або білок A St. aureus) не визначали антитіл класу IgM, що першими синтезуються у зараженому організмі, а тому й не давали можливості виявити антитіла до ВІЛ у осіб на ранній стадії інфікування. Спроба вирішити проблему, створивши тест-системи лише для визначення антитіл класу IgM виявилася невдалою: на початковій стадії ВІЛ-інфекції рівні IgM теж

досить незначні. Створення принципово нових кон'югатів (на основі рекомбінантних і/або синтетичних пептидів, мічених ферментом) дозволяє виявляти як IgG, так і IgM, а також IgA; такий заду́м успішно втілюється у тест-системах 3-го покоління, застосування яких дало можливість скоротити період "вікна" в середньому до 20 днів. Крім того, у діагностикумах 3-го покоління на твердій фазі, як правило, засорбовано антигени з детермінантами, специфічними не тільки для ВІЛ-2 та для основних субтипів ВІЛ-1, але і для менш поширеного субтипу О ВІЛ-1. На сьогодні саме імуноферментні тест-системи 3-го покоління найширше застосовуються в діагностичній практиці [23].

Наступним успіхом в розробці тест-систем на основі ІФА було створення так званих комбінованих тестів – діагностикумів 4-го покоління, призначених для одночасного виявлення і антигел до ВІЛ, і вірусного антигену р24 ВІЛ-1. За даними фірм-виробників, такі діагностикуми дають змогу виявляти маркери інфікування ВІЛ на 4-8 днів раніше, ніж при використанні наборів 3-го покоління, а при високій концентрації антигену р24 у пробі сироватки крові тести 4-го покоління скорочують період "вікна" в середньому на 2 тижні [23,24]. Слід, однак, зазначити, що при застосуванні комбінованих тестів позитивні результати первинного дослідження потребують додаткової верифікації на антиген р24; це ускладнює процес перевірки та вимагає більших затрат [23].

"Золотим стандартом", який підтверджує специфічність отриманого позитивного результату при тестування на ВІЛ методом ІФА, сьогодні залишається імуний блотинг (імуноблот – ІБ, або Western blot – WB), який базується на поєднанні електрофорезу в гелі та взаємодії антигенів з антитілами. У поліакриламідному гелі відбувається розподіл попередньо очищених антигенів ВІЛ за молекулярною масою; потім їх переносять на нітроцелюлозну мембрану, яку розрізують на стрічки. Досліджуваний матеріал (сироватку або плазму крові пацієнта) наносять на стрічки та, в разі наявності в пробі специфічних антител, ці антитіла зв'язуються з відповідними (комплементарними до них) смугами антигенів. Результат такої

## DIA-HIV-Ag/Ab

тест-система імуноферментна

### IV покоління для одночасного визначення антител специфічних до ВІЛ 1/2 та корового антигену ВІЛ (p24)

"DIA-HIV-Ag/Ab" – тест-набір призначений для скринінгових і підтверджуючих досліджень сироватки та плазми крові людини на наявність корового антигену вірусу імунодефіциту людини (p24) та сумарних антител (IgG, IgM, IgA) до ВІЛ 1/2 методом твердофазного імуноферментного аналізу.

"DIA-HIV-Ag/Ab" - діагностикум нової генерації для раннього виявлення ВІЛ-інфекції на основі рекомбінантних білків та моноклональних антител; одночасно в одному аналізі можна виявляти як антигени ВІЛ, так і антитіла проти нього, що покращить діагностику за рахунок зменшення "сероконверсійного вікна".

Характерною особливістю тест-системи є використання рекомбінантних білків-аналогів оболонкових антигенів ВІЛ-1 і ВІЛ-2 - env1 (gp120, gp41) та env2 (gp36), відповідно. Для виявлення корового антигену ВІЛ – p24 застосовуються моноклональні антитіла до p24 (в складі імуносорбенту) та біотинільовані поліклональні афінноочищені антитіла до рекомбінантного антигену p24 (антитіла детекції).

Для визначення антигену p24 застосовано метод молекулярного підсилення на основі біотин-стрептавідинової взаємодії, тож поряд з біотинільованими антитілами використовуються пероксидазний кон'югат стрептавідину. Анти-ВІЛ специфічні антитіла виявляють за принципом "сандвіч"-варіанту ІФА, де Fab-фрагменти анти-ВІЛ специфічних антител зв'язуються як з рекомбінантними антигенами на твердій фазі, так і з антигенами в складі імуноферментного кон'югату.

виробництва Медико-біологічного Союзу (МБС, Росія). До складу панелі входять 20 зразків ліофілізованих сироваток - 50 зразків сироваток крові донорів, що не містять антитіл до ВІЛ.

Встановлено, що специфічність даної тест-системи на застосованій панелі сироваток та зразках донорської крові становила 100 %.

#### **Особливості та переваги тест-системи**

- Висока чутливість і специфічність.
- Використання високоочищених і високоспецифічних моноклональних антитіл проти антигену р24 ВІЛ в складі імуносорбенту.
- Використання в якості кон'югатів поліклональних афіноочищених біотинильованих антитіл до білку р24 і стрептавідину, міченого пероксидазою.
- Одночасна інкубація сироваток і кон'югату № 1 в лунках планшета.
- Візуальний контроль внесення кон'югату до зразків сироватки або плазми крові в лунки планшета за рахунок зміни кольору розчину.
- Відкрита система, що легко адаптується до умов рутинного серологічного тестування.
- Загальноприйнята стандартизація обліку результатів.
- Тривалість аналізу 2,5 години.
- Один набір розраховано на 192 аналізу.
- Різні варіанти комплектації наборів по вибору споживача: стриповий або монолітний планшет, хромоген ТМБ або ОФД.
- Термін придатності 12 місяців.

взаємодії візуалізують шляхом послідовного додавання кон'югату, міченого ферментом, та проявника. Інтерпретацію результатів досліджень здійснюють відповідно до інструкції для конкретної тест-системи [25].

Поряд з діагностикумами, базованими на класичному ІБ, існують і так звані "лінійні" тести, які також застосовують для підтвердження первинно позитивних результатів ІФА. Ці тести відрізняються від класичних тим, що тут використовують рекомбінантні або синтетичні пептидні антигени, нанесені на нітроцелюлозні стрічки. Вважається, що лінійним тестам притаманна вища специфічність порівняно з класичним варіантом ІБ, оскільки тут відсутні компоненти клітин, здатні перехресно реагувати з компонентами досліджуваних зразків сироваток [25].

Проведення досліджень на антитіла до ВІЛ за допомогою ІФА та ІБ передбачає наявність добре оснащених діагностичних лабораторій, укомплектованих усім необхідним обладнанням. Але досить часто проведення таких досліджень утруднене або неможливе, особливо в невеликих периферійних лікарнях або лабораторіях. У цих випадках для термінового обстеження донорської крові, для обстеження невеликої кількості пацієнтів (передусім у невідкладних випадках, а також для приватних осіб з метою встановити зараження ВІЛ) доцільно використовувати так звані швидкі/прості тести [26].

Швидкі/прості тести для виявлення антитіл до ВІЛ – це діагностичні набори (тест-системи), застосування яких дозволяє отримати результат без використання спеціального обладнання для проведення ІФА. Як матеріал для дослідження можна використовувати зразки нефракціонованої крові, сироватки або плазми крові. Розроблені та застосовуються також швидкі тести для визначення антитіл до ВІЛ у зразках слини та сечі.

Більшість швидких тестів дає змогу диференційовано виявляти антитіла до ВІЛ-1 та ВІЛ-2. В самих тестах передбачено утворення контрольної плямки або смуги, яка дозволяє перевірити коректність проведеного аналізу. Слід зазначити, що хоча застосування швидких тестів не потребує спеціального обладнання для проведення аналізу, вартість

одного дослідження вища, ніж при використанні традиційного ІФА. Крім того, отримані результати тестування оцінюються візуально, тобто витлумачуються суб'єктивно; при цьому не залишається документально підтвердженого результату аналізу. Враховуючи цю обставину, при використанні швидких тестів надзвичайно важливо переконатися у високому рівні професійної підготовки персоналу, який здійснює дослідження.

Безпосереднє визначення вірусу для діагностики ВІЛ-інфекції на практиці використовують значно рідше, ніж виявлення антитіл до ВІЛ, антигенів збудника або його генетичного матеріалу; це обумовлено рядом причин. В основі вірусологічних методів виявлення ВІЛ лежить культивування лімфоцитів, отриманих від хворого або вірусоносія, чи спікультивування зі стимульованими лімфоцитами від неінфікованих осіб або з чутливими клітинними лініями. У культурах періодично визначають наявність зворотної транскриптази ВІЛ та/або вірусного антигену. Проте виділити та ідентифікувати вірус вдається не завжди, що пов'язано як з тимчасовим нетривалим характером віремії, так і з нестійкістю вивільнення вірусу з клітини [27].

Дослідженнями доведено двохвиловий характер антигенемії при ВІЛ-інфекції. Первинну тимчасову антигенемію спостерігають через 1-3 тижні після зараження. Антигеном, що вільно циркулює у крові на цій стадії, є білок р24, бо на ранніх стадіях інфекції він недостатньо зв'язується специфічними антитілами, яких ще мало. При наростанні титрів антитіл проти ВІЛ первинна антигенемія припиняється. Проте встановлено, що, незважаючи на зникнення вірусу з току крові, невинне його розмноження відбувається в лімфоїдних тканинах. Повторна антигенемія, що проявляється вже пізніше – це погана прогностична ознака, що провіщає розвиток СНІДу. Вважають, що антигени ВІЛ зникають через зв'язування їх антитілами та потім з'являються знову через пониження титрів антитіл [28,29].

Для виявлення антигенів ВІЛ (насамперед, вірусного білку р24) розроблені та використовуються тест-системи ІФА, застосування яких з метою ранньої діагностики ВІЛ-інфекції

### Характеристика показників якості тест-системи «DIA-HIV-p24<sup>1/2</sup>»

#### **Чутливість**

Визначення чутливості тест-системи „DIA-HIV-p24” проводили, використовуючи:

- стандартну панель охарактеризованих сироваток, що містять антиген р24 в різних концентраціях „HIV-p24 Antigen Mixed Titer Performance Panel”, виробництва BBI (Boston Biomedica Inc., США) – PRA901. До складу панелі входять 18 зразків сироваток та плазми, що містять коровий антиген ВІЛ – р24 в різних концентраціях (шістнадцять з них містять ще і антитіла), а також один зразок негативної сироватки та один зразок негативної плазми в якості негативних контролів.

- нативний коровий антиген р24 HIV1<sub>пш</sub> Purified Native Protein виробництва Advanced Biotechnologies (США).

З 18 зразків сироваток, що містять антиген р24 в різних концентраціях, всі були виявлені позитивними, обидва негативних зразка цієї панелі були негативними. Чутливість тест-системи при перевірці на стандартній панелі становила 100 %.

Згідно з Аналітичною нормативною документацією (АНД) тест-система „DIA-HIV-p24” повинна достовірно визначати 20 пг/мл та вище корового антигену ВІЛ (р24) при перевірці її з використанням очищеного нативного антигену р24 „HIV1<sub>пш</sub> Purified Native Protein”. Для оцінки чутливості цей нативний антиген двократно титрували починаючи з концентрації від 640, 320, 160, 80, 40 до 20 пкг/мл. Встановлено, що чутливість тест-системи DIA-HIV-p24 щодо виявлення антигену р24 становила 20 пікограм на мілілітр.

#### **Специфічність**

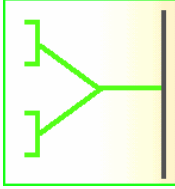
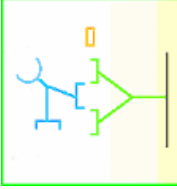
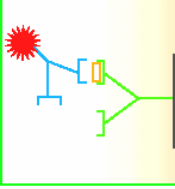
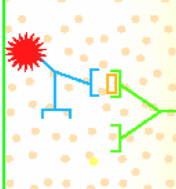
Специфічність тест-системи „DIA-HIV-p24” перевіряли, використовуючи:

- стандартну панель сироваток, що не містять антитіла до вірусу імунодефіциту людини ОСО 42 28-214-94 серія 009

Пероксидазну реакцію зупиняють, додаючи стоп-реагент, і вимірюють оптичну густину (ОГ) суміші у лунках, яка при довжині хвилі 450 нм пропорційна концентрації p24 у зразках сироваток або плазми крові.

## Схема 2 Проведення ІФА на тест-системі "DIA-HIV-p24"

Етапи аналізу

Процедура	Формування комплексу
Полістиролові стрипи, сенсibilізовані моноклональними антитілами до p24	
Внесення в лунки по 100 мкл зразків контролів і сироваток та по 50 мкл розчину кон'югату № 1. Інкубація протягом 60 хв при 37 °С (формування комплексу МКА-p24-АТ+ біотин).	
Промивання 6 разів буферним розчином. Внесення в лунки розчин кон'югату № 2. Інкубація протягом 30 хв. Приєднання стрептавідину, міченого ПХ до біотину.	
Внесення в лунки по 100 мкл розчину проявника (перекису водню та хромогену). Інкубація 30 хв. при кімнатній температурі (забарвлення). Зупинення реакції стоп-реагентом. Реєстрація оптичної густини.	

стало загально визнаним методичним прийомом. Однак відомо, що вільний p24, не зв'язаний з антитілами, циркулює в крові інфікованої особи лише на початку хвороби та в термінальній стадії; тому застосування тест-систем на основі виявлення p24 в повсякденній лабораторній діагностиці ВІЛ-інфекції донедавна було обмежене. Останнім часом з'явився ряд повідомлень про вдосконалення методик імуноферментного виявлення антигену p24, що призвело до істотного підвищення чутливості аналізу [23].

У ряді випадків (діагностика інфекції в серонегативному періоді, у дітей, народжених від ВІЛ-позитивних матерів, тощо) ефективність визначення ВІЛ-інфекції за допомогою стандартних методів, насамперед шляхом виявлення антитіл, недостатня. Впровадження в лабораторну практику молекулярно-біологічних методів досліджень, в першу чергу, методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), відкрило нові перспективи у діагностиці ВІЛ-інфекції. За допомогою ПЛР можна виявити РНК або ДНК ВІЛ, навіть при повній відсутності або мінімальної кількості антитіл у крові, коли їх не вдається виявити серологічними методами. Оскільки після зараження РНК ВІЛ вдається визначити в середньому на 11 днів раніше, ніж антитіла до збудника, запропоновано застосовувати ПЛР як найефективніший шлях звуження "сероконверсійного вікна" при тестуванні донорської крові на ВІЛ [29].

Як матеріал для дослідження методом ПЛР можна використати препарати, виділені не тільки з свіжих біосубстратів, але й із заморожених, висушених або фіксованих зразків, що містять нуклеотидні послідовності частково зруйнованих нуклеїнових кислот. ПЛР розширює можливості діагностики ВІЛ-інфекції завдяки спроможності виявляти зараження на ранніх його етапах (до сероконверсії), визначати концентрацію вірусу, експресію його генів, контролювати ефективність лікування, прогнозувати перебіг ВІЛ інфекції тощо. Методом ПЛР можна виявляти ВІЛ у крові як у вигляді провірусної ДНК, інтегрованої в геном моноклеонарних клітин периферичної крові, так і у вигляді вільної РНК. На сьогодні визначення провірусної ДНК методом ПЛР застосовують саме

для діагностики ВІЛ-інфекції, а визначення віріонної РНК ВІЛ – для визначення концентрації вірусу (вірусного навантаження) в крові з метою прогнозу перебігу хвороби, перевірки дієвості противірусної терапії тощо.

Науково-виробнича компанія „Діапроф-Мед” розробила і випускає три тест-системи для імуноферментної діагностики ВІЛ-інфекції:

DIA-HIV1/2 – тест-система імуноферментна III покоління для виявлення специфічних антитіл до ВІЛ 1/2.

DIA-HIV-p24 – тест-система імуноферментна для кількісного визначення корового антигену ВІЛ 1 (p24).

DIA-HIV-Ag/Ab – тест-система імуноферментна IV покоління для одночасного визначення антитіл, специфічних до ВІЛ 1/2 та корового антигену ВІЛ-1 (p24).

### **DIA-HIV-p24** **тест-система імуноферментна** **для кількісного визначення корового антигену** **ВІЛ 1 (p24)**

Тест-система DIA-HIV-p24 призначена для дослідження сироватки та плазми крові людини на наявність корового антигену p24 вірусу імунодефіциту людини першого типу. Для визначення антигену p24 було застосовано метод молекулярного підрізання на основі біотин-стрептавідинової взаємодії, тож поряд з біотинізованими антитілами використовували пероксидазний кон'югат стрептавідину.

Набір включає наступні компоненти: імуносорбент – полістироловий планшет, лунки якого сенсibilізовані моноклональними антитілами до p24 ВІЛ-1; кон'югат №1 – кролячі поліклональні афіноочищені біотинильовані антитіла до білку p24 і кон'югат №2 – стрептавідін, кон'югований з ферментом пероксидазою хрому, у стабілізуючому розчині; позитивний контроль – інактивована сироватка крові людини, яка містить коровий антиген p24 ВІЛ з відомою концентрацією; негативний контроль – сироватка крові людини, яка не містить коровий антиген p24 і поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg) та антитіла до ВІЛ, вірусу гепатиту С, збудника сифілісу *Treponema pallidum*; хромоген ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин); концентрат фосфатного буферу для промивання планшетів; розчин для розведення кон'югату; розчин для приготування проявника та стоп-реагент.

При внесенні в лунки планшету зразків сироваток інфікованої крові та поліклональних афіноочищених біотинильованих антитіл до білку p24, антиген p24 зв'язується зі специфічними антитілами на твердій фазі, утворюючи комплекс – МКА-p24-АТ-біотин. Після 6 разового відмивання в лунки додають стрептавідін, мічений пероксидазою, який взаємодіє з біотином. Після інкубації та відмивання незв'язаних компонентів в лунки додають розчин проявника – субстрат пероксидази (перекис водню) та хромоген – (ТМБ).

### Особливості та переваги тест-системи

- Висока чутливість і специфічність.
- Використання високоочищених і високоспецифічних рекомбінантних білків в складі імуносорбенту та імуноферментного кон'югату.
- Можливість виявлення всіх класів вірусспецифічних імуноглобулінів, що обумовлює високу чутливість тест-системи в період ранньої сероконверсії.
- Одночасна інкубація сироваток і кон'югату в лунках планшета.
- Візуальний контроль внесення зразків сироватки або плазми крові в лунки планшета за рахунок зміни кольору розчину.
- Відкрита система, що легко адаптується до умов рутинного серологічного тестування.
- Загальноприйнята стандартизація обліку результатів.
- Тривалість аналізу 2,5 години.
- Один набір розраховано на 192 аналізів.
- Різні варіанти комплектації наборів по вибору споживача: стриповий або монолітний планшет, хромоген ТМБ або ОФД.
- Термін придатності 15 місяців.

### DIA-HIV1/2

#### тест-система імуноферментна

#### III покоління для виявлення специфічних антитіл до ВІЛ 1/2

«DIA-HIV 1/2» - тест-набір призначений для виявлення сумарних (IgM, IgG) антитіл до ВІЛ-1 і ВІЛ-2 у сироватці та плазмі крові людини методом твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA).

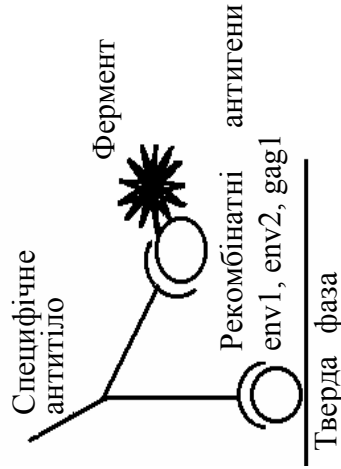
Характерною особливістю тест-набору є збалансованість усіх його компонентів, використання високоочищених і специфічних рекомбінантних білків у складі імуносорбенту та імуноферментного кон'югату, оригінальна та оптимальна рецептура розчинів. Все це як і ряд ноу-хау в технології виробництва даної продукції, зумовлюють високі показники якості тест-системи «DIA-HIV 1/2», зокрема, високу чутливість і специфічність, можливість виявляти антитіла до ВІЛ першого та другого типів на ранніх етапах інфекції.

#### Принцип аналізу

Основні компоненти набору «DIA-HIV 1/2» – імуносорбент та імуноферментний кон'югат. Імуносорбент представляє собою стриповий полістироловий планшет, в лунках якого сорбовані рекомбінантні поліпептиди - аналоги поліпептидів ВІЛ 1 - env-1 (gp120, gp41), gag-1 (p24, p17) і ВІЛ 2 - env-2 (gp36). Кон'югат представляє собою суміш рекомбінантних поліпептидів - аналогів білків ВІЛ 1 (env-1, gag-1) і ВІЛ 2 (env-2), кон'югованих з пероксидазою хрому.

Процес аналізу – це одноетапна процедура з одночасною інкубацією досліджуваних сироваток і кон'югата. При внесенні в лунки планшетів кон'югату і зразків сироваток крові, ВІЛ-специфічні антитіла, якщо вони знаходяться у сироватці, зв'язуються, як з рекомбінантними антигенами на твердій фазі, так і з антигенами імунопероксидазного кон'югату, створюючи комплекс антиген-антитіло. Після відмивання в лунки додають

розчин проявника, що містить субстрат пероксидази (перекис водню) і хромоген (ОФД або ТМБ). При наявності в комплексі на твердій фазі імунопероксидазного кон'югату розчин забарвлюється.



Пероксидазну реакцію зупиняють додаючи стоп-реагент і вимірюють оптичну густину при 492/620 нм (при використанні хромогену ОФД) або 450/620 нм (при використанні хромогену ТМБ).

На схемі 1 показана поетапна послідовність проведення імуноферментної реакції на тест-системі «DIA-HIV 1/2»

### Специфічність

Визначення специфічності тест-системи «DIA-HIV 1/2» проводили як при дослідженні популяції з низьким ризиком інфікування (донори крові), так і осіб з груп високого ризику інфікування (ін'єкційні наркомани), а також на зразках сироваток крові медичних працівників, вагітних жінок і зразках інтерферентної групи пацієнтів. До останньої групи відносили сироватки від хворих різними інфекційними захворюваннями, що класифікуються, як гепатити В і С, ЦМВ-інфекція, герпетична інфекція, туберкульоз, червоничка (краснуха), сифіліс. Дані приведені в таблиці 4.

Таблиця 4. Визначення специфічності тест-системи «DIA-HIV 1/2» на зразках сироваток різних груп пацієнтів

Дослідна група	Кількість досліджень	Кількість негативних результатів в «DIA-HIV 1/2»	Специфічність, %
Донори крові	221541	221098	99.7
Медпрацівники	1643	1636	99.6
Вагітні	2481	2468	99.5
Ін'єкційні наркомани	82	82	100
Хворі з інтерферентними захворюваннями	309	307	99.3

При тестуванні зразків сироваток крові всіх груп досліджуваних осіб тест-система «DIA-HIV 1/2» демонструє високу специфічність.

При дослідженні специфічності тест-системи «DIA-HIV 1/2» на панелі негативних сироваток виробництва ДСК ім. Л.А. Тарасевича не було отримано хибно-позитивних результатів.



Таблиця 3. Оцінка інформативності тест-системи „DIA-HIV 1/2” на сероконверсійних панелях сироваток

Панель	№ зразка	Enzygnost Anti-HIV 1/2 Plus	Viro-nostika HIV Uni-form II Plus O	DIA-HIV 1/2	Панель	№ зразка	Enzygnost Anti-HIV 1/2 Plus	Viro-nostika HIV Uni-form II Plus O	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	6-9	P	P	P
BBI PRB 912 L	1	P	N	P	BBI PRB 932 AG	1-3	N	N	N
	2-6	P	P	P	BBI PRB 944 AT	5-9	P	P	P
BBI PRB 914 N	1-5	P	P	P	BBI PRB 945	1-4	N	N	N
	1-4	N	N	N	BBI PRB 946	5-6	P	P	P
BBI PRB 917 Q	5-7	P	P	P	BBI PRB 947	1-9	N	N	N
	1	N	N	N	BBI PRB 948	10-13	P	P	P
BBI PRB 927 AB	2-5	P	P	P	BCPI-6240				
	1	N	N	N					
BBI PRB 928 AC	2-5	P	P	P					
	1	N	N	N					

P – позитивний; N – негативний

Схема 1. Проведення ІФА на тест-системі «DIA-HIV 1/2»

Етапи проведення аналізу

Процедура	Формування комплексу
<ul style="list-style-type: none"> <li>Полістиролові стрипи, сенсйбілізовані білками env-1, env-2, gag-1</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Внесення в лунки по 60 мкл розчину кон'югату і по 30 мкл зразків контролів і сироваток</li> <li>Інкубація протягом 90 хв. при 37 °С (формування комплексу антиген-антитіло з кон'югатом)</li> <li>Промивка 8 разів буферним розчином</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Внесення в лунки по 100 мкл розчину проявника (перекис водню та хромоген)</li> <li>Інкубація 30 хв. при кімнатній температурі (забарвлення)</li> <li>Зупинення реакції додаванням стоп-реагенту</li> <li>Ресстрація оптичної густини</li> </ul>	

### Характеристика показників якості тест-системи «DIA-HIV 1/2»

#### **Чутливість**

Визначення чутливості тест-системи «DIA-HIV 1/2» проводили на панелях охарактеризованих сироваток виробництва Boston Biomedica Inc. (США), Агентства по контролю безпеки лікарських засобів (AFSSAPS, Франція), Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського АМН України (IEIX), Державного інституту стандартів и контролю медичних біологічних препаратів ім. Л.А. Тарасевича (ДІСК, Росія). В таблиці 1 приведені характеристики панелей сироваток.

Таблиця 1. Характеристика панелей сироваток

Панель	Характеристика зразків сироваток панелі
PRB106 (BBI)	анти-BII-1 низькоцитражі (14), анти-BII негативна (1)
PRB107 (BBI)	анти-BII-1 низькоцитражні (14), анти-BII негативна (1)
AFSSAPS	BII-1 пресероконверсія (2), BII-1 рання сероконверсія (13), BII-1 різних субтипів (10), BII-2 позитивні (10), негативні перехресно-реагуючі (5)
IEIX	BII-1 рання сероконверсія (16), BII-1 носійство (15), СНІД-асоційований комплекс (8), СНІД (7), від BII-1 інфікованих новонароджених (10), від донорів крові (46)
ДІСК	анти-BII-1 позитивні (16), анти-BII-2 позитивні (8)

Результати визначення чутливості тест-системи «DIA-HIV 1/2» на вищезгаданих панелях представлені в таблиці 2.

Таблиця 2. Визначення чутливості тест-системи «DIA-HIV 1/2» на панелях сироваток

Панель	Кількість позитивних зразків із загальної кількості зразків в панелі	Кількість позитивних результатів в наборі «DIA-HIV 1/2»
PRB106	14 з 15	14
PRB107	14 з 15	14
AFSSAPS	33 з 40	33
IEIX	54 з 100	54
ДІСК BII1	16 з 16	16
ДІСК BII2	8 з 8	8

Чутливість оцінювали також при використанні 346 зразків сироваток крові від BII-1 інфікованих осіб, 78 зразків, які містять антитіла до BII-2 і 2 зразка від осіб, інфікованих BII-O. При тому всі зразки були визнані як позитивні.

Здатність тест-системи «DIA-HIV 1/2» виявляти ранню сероконверсію була визначена при тестуванні 11 сероконверсійних панелей (Boston Biomedica Inc., BioClinical Partners Inc.). Згідно отриманим результатам, тест-система «DIA-HIV 1/2» дозволяє виявляти BII-інфекцію у пацієнтів на рівні чутливості тест-наборів третього покоління для виявлення антитіл до BII закордонних виробників. Результати цих досліджень представлені в таблиці 3.