

УДК 616.096.578.827

Т.Ю. Трохимчук¹, Л.О. Ганова²,
В.О. Шевчук¹, В.Г. Сердюк¹,
С.В. Міхалап¹, Ю.І. Горлов¹,
М.Я. Співак²

ДІАГНОСТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВИСОКОЧУТЛИВОЇ ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ОДНОЧАСНОГО ВИЯВЛЕННЯ АНТИГЕНУ Р24 ТА АНТИТІЛ ДО ВІЛ-1 ТА ВІЛ-2

¹ ПрАТ "НВК "Діапроф Мед", Київ, Україна

² Інститут мікробіології та вірусології
імені Д.К. Заболотного НАН України

Розповсюдження ВІЛ-інфекції набуває характеру глобальної катастрофи. За даними Об'єднаної програми ООН по СНІДу — UNAIDS, опублікованими в 2011 р. [6], в світі інфіковано близько 33,3 млн. осіб, серед яких 15,9 млн. жінки та 2,5 млн. діти до 15 років.

В Україні ВІЛ-інфекція уражує переважно молоде населення. У 66% випадків цю інфекцію діагностовано у віці до 30 років.

Тенденція до зростання кількості ВІЛ-інфікованих відмічається і в Україні. У 2011 р. в країні було зареєстровано 21 204 нових випадки зараження цим вірусом, 9 199 осіб померли від СНІДу [1]. Станом на 1.07.2012 зареєстровано 124 222 ВІЛ-інфікованих, приріст інфікованих складає 1,35% за рік [2]. При збереженні такої тенденції існує ризик, що в 2014 р. 479–820 тис. осіб в Україні будуть жити з ВІЛ. Такі статистичні дані свідчать про погіршення епідеміологічної ситуації. Зберігається високий рівень захворюваності на ВІЛ-інфекцію та не знижуються темпи приросту нових випадків зараження, збільшується загальна кількість ВІЛ-інфікованих та число смертей від СНІДу [3].

Аналогічна несприятлива тенденція розвитку ВІЛ/СНІДу є характерною для більшості інших держав пострадянського простору. В звітах UNAIDS повідомляється про надзвичайно швидкі темпи розповсюдження ВІЛ-інфекції в країнах Східної Європи та Центральної Азії. В цих регіонах кількість осіб, що живуть з ВІЛ, становить 1,5 млн. осіб, що в 3,5 рази вище, ніж в 2011 році (410 000 випадків) і більше ніж в 10 раз перевищує показники 1991 року.

Тому своєчасне виявлення ВІЛ-інфекції, запровадження нових та вдосконалення існуючих

методів діагностики є перспективним напрямком при проведенні заходів по запобіганню розповсюдження даного захворювання.

При скринінгових дослідженнях населення на ВІЛ-інфекцію здебільшого використовують серологічні методи, зокрема імуноферментний аналіз (ІФА). За останні 30 років імуноферментні тест-системи еволюціонували від діагностикумів, сконструйованих за принципом непрямого ІФА з використанням лізатних антигенів ВІЛ (перше покоління тест-систем), потім рекомбінантних білків (друге покоління), до "сендвіч"-варіантів діагностичних систем третього та четвертого покоління. В діагностикумах третього та четвертого покоління рекомбінантні пептиди використовуються в складі імуносорбенту та кон'югату, що дає змогу виявляти сумарні антитіла різних класів (IgG, IgM, IgA) та скорочує період "сероконверсійного вікна". Тест-системи четвертого покоління (комбіновані тести) дозволяють виявляти в досліджуваних зразках не лише специфічні антитіла (Ат), але і антиген р24 ВІЛ-1 (Аг) за рахунок введення в систему моноклональних антитіл (МКАТ) до даного антигену [4]. Така конфігурація тест-системи підвищує її чутливість та дає змогу виявляти вірус на більш ранніх строках, коли специфічні антитіла ще відсутні.

Аналіз результатів тестування комерційних ВІЛ-сероконверсійних панелей сироваток виробництва Boston Biomedica Inc. та ZeptoMetrix corp. (США) в різних тест-системах показує, що чутливість комбінованих ІФА-тестів наближається до аналогічного показника ПЛР-аналіза. Тому зараз комбіновані тести набувають широкого розповсюдження при скринінгових дослідженнях донорської крові для виявлення маркерів ВІЛ-інфекції.

Широке використання комбінованих тестів службою крові вимагає подальшого їх вдосконалення. Тому розробники та виробники даних діагностикумів постійно випробовують новітні підходи для подальшого покращення параметрів чутливості та специфічності комбінованих тестів.

В 2001 р. на підприємстві ПрАТ "НВК "Діапроф Мед" (Київ, Україна) було розроблено високочутливу імуноферментну тест-систему "DIA-HIV-Ag/Ab" четвертого покоління для одночасного виявлення в сироватці або плазмі крові людини Аг та Ат різних класів (IgG, IgM, IgA) до ВІЛ-1 та ВІЛ-2. Метою даної роботи стало вивчення діагностичних характеристик розробленої нами тест-системи.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для досліджень використовували матеріали, перераховані нижче.

Позитивні сироватки від ВІЛ-інфікованих хворих (837 зразків), отримані з обласних центрів СНІДу України.

Сироватки крові донорів з обласних станцій переливання крові (2487 зразків), що не містять маркерів ВІЛ-інфекції.

Перший Міжнародний стандарт Аг (HIV-1 p24 antigen, NIBSC, Великобританія).

Контрольний зразок Аг (HIV-1ПВ p24 gag) — очищений вірусний білок (ABI, США).

Перша Міжнародна референс-панель 02/210 (1-st International reference panel for anti-HIV), що містить зразки плазми крові людини з Ат до різних субтипів та груп ВІЛ (NIBSC, Великобританія).

“Стандарт АГ(+) ВІЧ-1 p24 МБА” — панель сироваток крові людини, зразки якої містять Аг в різній концентрації (від 0,2 до 200 пкг/мл). Набір призначено для оцінки якості імуноферментних тест-систем, що використовуються для виявлення Аг (ООО “МедБиоАльянс”, Росія).

“Стандарт АТ(+) ВІЧ-1 МБА” — панель сироваток крові людини, зразки якої містять Ат до ВІЛ-1 в різній концентрації (ООО “МедБиоАльянс”, Росія). Панель призначено для оцінки якості ІФА тест-систем.

“Стандарт АТ(+) ВІЧ-2 МБА” — панель сироваток крові людини, зразки якої містять Ат до ВІЛ-2 в різній концентрації (ООО “МедБиоАльянс”, Росія). Панель призначено для оцінки якості ІФА тест-систем.

“Стандарт АТ(–) ВІЧ МБА” — панель сироваток крові людини, зразки якої не містять Ат до ВІЛ-1 та ВІЛ-2 (ООО “МедБиоАльянс”, Росія). Панель призначено для оцінки якості ІФА тест-систем.

Сероконверсійні панелі сироваток крові від ВІЛ-інфікованих пацієнтів — PRB 950, PRB 958, PRB 959 (ВВІ, США).

Панель сироваток від ВІЛ-інфікованих пацієнтів, зразки якої містять Аг в різних титрах та Ат до ВІЛ-1 та ВІЛ-2 — “HIV p24 Antigen Mixed Titer Performance Panel PRA-203” (ВВІ, США).

Стандартна панель сироваток “СПП-ВІЛ 1/2”, зразки якої містять Ат до ВІЛ-1 та ВІЛ-2 в різній концентрації (ПрАТ “НБК “Діапроф-Мед”). Панель зареєстровано в Україні, призначено для оцінки якості ІФА тест-систем.

Стандартна панель сироваток “СПН-ВІЛ 1/2”, зразки яких не містять Ат до ВІЛ-1 та ВІЛ-2, а також Аг (ПрАТ “НБК “Діапроф-Мед”). Панель зареєстровано в Україні, призначено для оцінки якості ІФА тест-систем.

Статистичне оброблення результатів.

Для встановлення достовірності отриманих даних використано показники середнього арифметичного результатів аналізу в трьох повторях, стандартної похибки та середньоквадратичного відхилення.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

Нами було розроблено тест-систему підвищеної чутливості “DIA-HIV-Ag/Ab” четвертого покоління, яку призначено для скринінгових та підтверджуючих досліджень сироваток та плазми крові людини на наявність Аг та сумарних Ат (IgG, IgM, IgA) до ВІЛ-1 та ВІЛ-2 методом ІФА.

Відмінною особливістю нової модифікації тест-системи є використання сполучення повнорозмірних та вкорочених рекомбінантних та синтетичних ВІЛ-специфічних антигенних конструкцій у складі імуносорбенту та імуоферментного кон’югату, а також введення системи біотин-стрептавідинового підсилення специфічного сигналу. Аг з досліджуваного зразка зв’язується з відповідними МКАТ в складі імуносорбенту та біотинильованого кон’югату. Специфічні Ат взаємодіють з Аг у складі імуносорбенту та біотинильованими Аг Env-1 та Env-2. Утворені імунні комплекси виявляють кон’югатом стрептавідину з полімерною формою пероксидази хрому (SDT, Німеччина). Проявляють ферментативну реакцію однокомпонентним розчином 3,3',5,5'-тетраметилбензидину.

Аналітичну чутливість створеної нами тест-системи визначали з використанням першого Міжнародного стандарту p24 ВІЛ-1 (NIBSC), контрольного зразка p24 ВІЛ-1 (ABI) (табл. 1) та стандартної панелі сироваток, зразки якої містять різну концентрацію Аг (ООО “МедБиоАльянс”, Росія) (табл. 2).

За даними табл. 1, аналітична чутливість розробленої нами тест-системи по виявленню контрольного зразка антигену p24 ВІЛ-1 (ABI) становила 2,5 пкг/мл, першого Міжнародного стандарту p24 ВІЛ-1 (NIBSC) — 1 МО/мл.

В табл. 2 наведено дані оцінювання аналітичної чутливості тест-системи “DIA-HIV-Ag/Ab” з використанням панелі “Стандарт АГ(+) ВІЧ-1 p24 МБА”, яка складається з 10 зразків сироваток крові людини, що містять Аг p24 ВІЛ-1 в різній концентрації.

Згідно з даними, наведеними в табл. 2, тест-система “DIA-HIV-Ag/Ab” визначає позитивні зразки №№ 1–4. Таким чином, аналітична чутливість даної тест-системи становить 20 пкг/мл Аг.

На наступному етапі визначення чутливості розробленої тест-системи проводили з використанням першої Міжнародної референс-панелі 02/210 (NIBSC), яка містить 6 зразків плазми

Таблиця 1

**Визначення аналітичної чутливості тест-системи “DIA-HIV-Ag/Ab”
з використанням стандартів ABI та NIBSC**

Контрольний зразок антигену p24 ВІЛ-1 (ABI, США)			Перший Міжнародний стандарт антигену p24 ВІЛ-1 (NIBSC, США)		
Концентрація, пкг/мл	ОГ	ОГ/ГЗ	Концентрація, МО	ОГ	ОГ/ГЗ
40	0,804±0,024	5,5±0,16	8	0,531±0,016	3,6±0,11
20	0,621±0,018	4,2±0,12	4	0,384±0,011	2,6±0,08
10	0,519±0,015	3,5±0,1	2	0,253±0,007	1,72±0,05
5	0,263±0,008	1,8±0,05	1	0,148±0,004	1,1±0,03
2,5	0,185±0,005	1,25±0,04	0,5	0,083±0,002	0,56±0,01

Примітка: ОГ — оптична густина; ОГ/ГЗ — співвідношення оптичної густини до граничного значення; МО — міжнародні одиниці.

Таблиця 2

**Визначення аналітичної чутливості тест-системи “DIA-HIV-Ag/Ab”
з використанням панелі “Стандарт АГ(+) ВІЧ-1 p24 МБА”**

№ зразка (концентрація p-24 ВІЛ-1)	ОГ	ОГ/ГЗ	№ зразка (концентрація p-24 ВІЛ-1)	ОГ	ОГ/ГЗ
1 (200 пкг/мл)	1,212±0,036	8,2±0,25	6 (5пкг/мл)	0,097±0,03	0,6±0,02
2 (100 пкг/мл)	0,631±0,019	4,3±0,13	7 (2,5пкг/мл)	0,069±0,02	0,4±0,01
3 (50 пкг/мл)	0,389±0,012	2,6±0,08	8 (1пкг/мл)	0,047±0,01	0,3±0,01
4 (20 пкг/мл)	0,195±0,006	1,3±0,04	9 (0,5пкг/мл)	0,048±0,01	0,3±0,01
5 (10 пкг/мл)	0,13±0,004	0,9±0,03	10 (0,2пкг/мл)	0,057±0,01	0,4±0,01

Примітка: ОГ — оптична густина; ОГ/ГЗ — співвідношення оптичної густини до граничного значення.

крові людини з Ат до різних субтипів та груп ВІЛ. Результати дослідження наведено в табл. 3.

Отримані результати демонструють, що тест-система “DIA-HIV-Ag/Ab” виявляє Ат до субтипів А, В, С і Е ВІЛ-1 групи М, Ат до ВІЛ-1 групи О та до ВІЛ-2, з високими значеннями показників ОГ/ГЗ.

В табл. 4 наведено результати дослідження параметра чутливості розробленої нами тест-системи з використанням панелі “Стандарт

АТ(+) ВІЧ-1 МБА” — яка містить 16 зразків сироваток крові людини, з Ат до ВІЛ-1 в різній концентрації.

Згідно отриманих даних, всі зразки панелі сироваток, що містять Ат до ВІЛ-1, виявлені позитивними з високим співвідношенням ОГ/ГЗ (від 21,1 до 23,1). Аналогічно виявлено позитивними всі 8 зразків панелі “Стандарт АТ(+) ВІЧ-2 МБА”, зразки якої містять Ат до ВІЛ-2 в різній концентрації (дані не наводяться).

Таблиця 3

**Результати дослідження першої Міжнародної референс-панелі 02/210 (NIBSC)
в тест-системі “DIA-HIV-Ag/Ab”**

№ зразка панелі	АТ до субтипів та груп ВІЛ	Результати	
		ОГ	ОГ/ГЗ
1	Анти-ВІЛ-1 субтип А, група М	3,387±0,10	23,0±0,69
2	Анти-ВІЛ-1 субтип В, група М	3,565±0,11	24,2±0,72
3	Анти-ВІЛ-1 субтип С, група М	3,319±0,10	22,5±0,67
4	Анти-ВІЛ-1 субтип Е, група М	3,233±0,09	21,9±0,66
5	Анти-ВІЛ-1 група 0	1,098±0,03	7,5±0,22
6	Анти-ВІЛ-2	3,195±0,09	21,7±0,65
7	Негативний контроль	0,063±0,002	0,42±0,012

Примітка: ОГ — оптична густина; ОГ/ГЗ — співвідношення оптичної густини до граничного значення.

**Результати дослідження чутливості тест-системи “DIA-HIV-Ag/Ab”
з використанням панелі “Стандарт АТ(+) ВІС-1 МБА”**

№ зразка панелі	Результати		№ зразка панелі	Результати	
	ОГ	ОГ/ГЗ		ОГ	ОГ/ГЗ
1	3,196±0,096	20,2±0,606	9	3,14±0,094	20,1±0,603
2	3,374±0,101	21,3±0,639	10	3,372±0,101	21,3±0,639
3	3,476±0,104	22,0±0,66	11	3,418±0,102	21,9±0,657
4	3,231±0,096	20,8±0,624	12	3,136±0,094	20,0±0,600
5	3,375±0,101	21,3±0,639	13	3,326±0,099	21,3±0,639
6	3,399±0,102	21,4±0,642	14	3,344±0,100	21,4±0,642
7	3,296±0,099	21,2±0,636	15	3,342±0,100	21,4±0,642
8	3,659±0,109	23,1±0,693	16	3,416±0,102	21,9±0,657

Примітка: ОГ — оптична густина; ОГ/ГЗ — співвідношення оптичної густини до граничного значення.

Для дослідження здатності тест-системи “DIA-HIV-Ag/Ab” визначати ранню ВІЛ-інфекцію було використано сероконверсійні панелі PRB 950, PRB 958, PRB 959 (BBI). Дані панелі складаються з зразків сироваток крові ВІЛ-інфікованих, отриманих в різні терміни після зараження.

В табл. 5 наведено результати тест-системи “DIA-HIV-Ag/Ab” при дослідженні сероконверсійної панелі PRB 950, яка складається з 4 сироваток, взятих у ВІЛ-інфікованого пацієнта в різні терміни після зараження (0, 18, 21 та 28 день забору крові).

Згідно з паспортними даними панелі PRB 950, тест-система “Abbott HIV Ag” виявляє позитивними зразки №№ 3 та 4, тест-система “Abbott HIV1/2” — лише №4, тест-система “Organon Teknika HIV” не визначає Ат в жодному зразку. Тест-система “DIA-HIV-Ag/Ab” визначає позитивними зразки №№ 2, 3 та 4.

В табл. 6 продемонстровано результати тест-системи “DIA-HIV-Ag/Ab” при дослідженні сероконверсійної панелі PRB 958, яка складається з 6 сироваток, взятих у ВІЛ-інфікованого пацієнта в різні терміни після зараження (0, 2, 7, 9, 15 та 17 день забору крові).

Згідно з паспортними даними панелі, у зразках №№ 1 та 2 відсутні специфічні Ат до ВІЛ та Аг. Тест-система “DIA-HIV-Ag/Ab” визначає позитивними зразки панелі, починаючи з № 3 (7 день після першого забору крові). Тест-система “Abbott HIV Ag” визначає позитивними зразки, починаючи з № 4, решта тест-систем — тільки починаючи з № 5 та 6.

У табл. 7 наведено результати дослідження тест-системи “DIA-HIV-Ag/Ab” з використанням сероконверсійної панелі PRB 959, яка містить 7 сироваток, взятих у ВІЛ-інфікованого пацієнта в різні терміни після зараження (0–26 діб).

В панелі PRB 959 тільки перша сироватка (PRB-959-1) визначена як негативна у всіх тест-системах. У ній не виявлені ВІЛ-специфічні Ат, Аг та РНК-ВІЛ. Всі інші зразки панелі в тест-системі “DIA-HIV-Ag/Ab” визначено позитивними з високими значеннями ОГ/ГЗ.

Параметр чутливості розробленої тест-системи було досліджено також з використанням стандартної панелі сироваток “HIV p24 Antigen Mixed Titer Performance Panel PRA-203” (BBI). Панель включає сироватки від ВІЛ-інфікованих пацієнтів, що містять Ат до ВІЛ та Аг в різній концентрації. Зразки №№ 9 та 19 не містять

Таблиця 5

**Результати дослідження чутливості тест-системи “DIA-HIV-Ag/Ab”
з використанням сероконверсійної панелі сироваток PRB 950 (BBI)**

Зразки панелі	Тест-системи, ОГ/ГЗ				
	День забору крові	Abbott HIV1/2	Organon Teknika HIV	Abbott HIV Ag	DIA-HIV-Ag/Ab
PRB 950-1	0	0,2	0,3	0,5	0,4±0,012
PRB 950-2	18	0,2	0,3	0,7	1,2±0,036
PRB 950-3	21	0,2	0,3	3,3	5,9±0,177
PRB 950-4	28	15,5	0,4	4,1	6,4±0,192

Примітка. Дані щодо чутливості тест-систем “Abbott HIV1/2”, “Organon Teknika HIV”, “Abbott HIV Ag” наведено згідно паспортних даних панелі.

Результати дослідження чутливості тест-системи “DIA-HIV-Ag/Ab”
з використанням сероконверсійної панелі сироваток PRB 958 (BBI)

Зразки панелі	Тест-системи, ОГ/ГЗ				
	День забору крові	Abbott HIV1/2	Organon Teknika HIV	Abbott HIV Ag	DIA-HIV-Ag/Ab
PRB-958-1	0	0,1	0,1	0,3	0,2±0,006
PRB-958-2	2	0,0	0,1	0,2	0,1±0,003
PRB-958-3	7	0,1	0,1	0,8	1,2±0,036
PRB-958-4	9	0,1	0,1	2,1	4,5±0,135
PRB-958-5	15	6,6	1,0	2,9	7,2±0,216
PRB-958-6	17	13,0	2,6	3,3	12,2±0,366

Таблиця 7

Результати дослідження чутливості тест-системи “DIA-HIV-Ag/Ab”
з використанням сероконверсійної панелі сироваток PRB 959 (BBI)

Зразки панелі	Тест-системи, ОГ/ГЗ				
	День забору крові	Abbott HIV1/2	Organon Teknika HIV	Abbot HIV Ag	DIA-HIV-Ag/Ab
PRB-959-1	0	0,3	0,4	0,3	0,5±0,015
PRB-959-2	7	>16,7	0,8	12,5	25,1±0,753
PRB-959-3	9	>16,7	0,8	8,1	24,9±0,747
PRB-959-4	14	>16,7	5,9	>12,5	8,3±0,249
PRB-959-5	19	>16,7	5,6	>12,5	5,4±0,162
PRB-959-6	21	>16,7	5,9	>12,5	6,1±0,183
PRB-959-7	26	>16,7	5,4	>12,5	6,7±0,201

маркерів ВІЛ-інфекції. Результати випробування тест-системи “DIA-HIV-Ag/Ab” з використанням даної панелі наведено у табл. 8.

Виходячи з отриманих даних, усі 18 позитивних зразків даної панелі в тест-системі “DIA-HIV-Ag/Ab” визначено позитивними, а зразки №№ 9 та 19 — негативними.

Результати випробування здатності тест-системи “DIA-HIV-Ag/Ab” виявляти Ат до ВІЛ-1 та ВІЛ-2 у порівнянні з її комерційними аналогами двох провідних світових виробників (далі позначено як тест-система № 1 та № 2) наведено в табл. 9. Для тестування використовували зареєстровану в Україні стандартну панель “СПП-ВІЛ 1/2”, що включає 20 зразків сироваток крові, отриманих від ВІЛ-позитивних пацієнтів.

Тест-система “DIA-HIV-Ag/Ab” та діагностиком порівняння №1 визначають позитивними усі зразки панелі, що містять Ат до ВІЛ-1 та ВІЛ-2, тоді як тест-система № 2 не виявляє дві сироватки з Ат до ВІЛ-2.

Для оцінки параметра чутливості розробленої тест-системи “DIA-HIV-Ag/Ab” було протестовано 837 нерозведених сироваток крові ВІЛ-інфікованих пацієнтів. Усі зразки було визначено позитивними в тест-системі “DIA-HIV-Ag/Ab”, при цьому у 9 зразках визначено Ат до ВІЛ у низькій концентрації (табл. 10).

З отриманих результатів видно, що тест-система “DIA-HIV-Ag/Ab” визначає усі 9 досліджуваних сироваток позитивними, однак співвідношення ОГ/ГЗ при цьому невисоке (від 1,4 до 7,4). Аналогічні результати отримано при аналізі даних зразків з використанням тест-системи № 2, тоді як в тест-системі № 1 три сироватки з дев'яти визначено негативними (хибнонегативні результати).

Параметр специфічності розробленої нами тест-системи “DIA-HIV-Ag/Ab” визначали з використанням стандартних панелей сироваток, що не містять маркерів ВІЛ-інфекції: “СПН-ВІЛ 1/2” (ПрАТ “НВК “Діапроф-Мед”), що містить 12 зразків, та “Стандарт АТ(-) ВІС-МБА”, що включає 20 сироваток. Усі зразки даних панелей визначено негативними. Крім того було проаналізовано 2487 зразків донорських сироваток, отриманих з різних станцій переливання крові (СПК) України, при чому хибнопозитивних результатів не спостерігалось.

Таким чином, за результатами аналізу значної вибірки донорських сироваток та зразків стандартних панелей, що не містять специфічних Ат до ВІЛ та Аг, параметр специфічності тест-системи “DIA-HIV-Ag/Ab” склав 100%.

У 2012 році тест-систему “DIA-HIV-Ag/Ab” було поставлено у заклади служби крові України.

**Результати випробовування тест-системи “DIA-HIV-Ag/Ab”
з використанням панелі сироваток “HIV p24 Antigen Mixed Titer Performance Panel PRA-203”**

Зразки панелі	Тест-системи, ОГ/ГЗ				
	Abbott Monoclonal HIV Ag	Dupont HIV Ag	Organon Teknik HIV Ag	IVCOMBI.CE 4th Generation	DIA-HIV-Ag/Ab
PRA203-01	4,3	5,7	16,8	2,3	2,3±0,069
PRA203-02	12,2	6,2	16,4	4,1	20,5±0,615
PRA203-03	6,0	8,7	9,3	1,4	4,2±0,126
PRA203-04	3,0	3,1	4,1	1,9	3,5±0,106
PRA203-05	4,9	1,2	8,2	—	27,9±0,837
PRA203-06	1,3	1,3	1,5	1,0	25,8±0,774
PRA203-07	5,7	2,8	12,1	2,9	25,9±0,777
PRA203-08	1,5	1,0	2,0	3,0	27,5±0,825
PRA203-09	0,5	0,2	0,2	0,4	0,8±0,024
PRA203-10	12,2	9,6	25,3	3,6	15,3±0,459
PRA203-11	3,1	3,9	5,8	2,4	2,8±0,086
PRA203-12	3,5	2,9	6,6	1,6	24,9±0,747
PRA203-13	2,1	1,1	2,4	1,2	9,3±0,279
PRA203-14	0,9	0,7	2,5	0,4	2,5±0,075
PRA203-15	2,5	2,8	5,9	3,3	2,8±0,084
PRA203-16	1,8	1,4	3,7	1,1	28,5±0,855
PRA203-17	6,3	4,0	6,1	2,5	17,5±0,525
PRA203-18	2,4	0,8	2,3	1,7	24,8±0,744
PRA203-19	0,5	0,2	0,3	0,4	0,3±0,009
PRA203-20	17,0	9,1	26,4	4,6	10,7±0,321

**Результати порівняльного дослідження тест-системи “DIA-HIV-Ag/Ab”
та її комерційних аналогів з використанням стандартної панелі сироваток “СПП-ВІЛ 1/2”**

№ зразка	Тест-системи, ОГ/ГЗ		
	№1	№2	DIA-HIV-Ag/Ab
1	17,3	11,1	25,1±0,753
2	17,6	11,2	22,0±0,66
3	17,3	11,2	24,7±0,741
4	17,4	11,1	23,9±0,717
5	4,8	11,6	22,8±0,684
6	6,1	10,0	22,5±0,675
7	7,7	10,6	22,8±0,684
8	13,4	11,4	22,2±0,666
9	16,8	11,6	23,4±0,702
10	17,6	11,2	22,9±0,687
11	16,3	11,2	23,3±0,699
12	17,1	11,2	25,6±0,768
13	17,1	11,5	23,2±0,696
14	18,7	10,2	23,8±0,714
15	5,7	10,9	23,4±0,702
16	9,2	11,4	24,6±0,738
17	11,3	10,4	23,7±0,711
18	16,1	10,6	22,9±0,687
19	17,0	0,5	22,1±0,546
20	15,6	0,4	21,2±0,467

Результати дослідження тест-системи “DIA-HIV-Ag/Ab” та її комерційних аналогів з використанням нерозведених сироваток від ВІЛ-інфікованих пацієнтів, що містять антитіла до ВІЛ в низькій концентрації

№ зразка	Тест-системи, ОГ/ГЗ		
	№ 1	№ 2	DIA-HIV-Ag/Ab
1	1,4±0,042	4,3±0,126	4,3±0,129
2	0,4±0,012	1,9±0,042	3,3±0,099
3	0,69±0,021	1,4±0,042	1,6±0,048
4	0,77±0,023	9,4±0,282	1,4±0,042
5	17,6±0,528	11,5±0,345	3,1±0,093
6	14,9±0,447	10,0±0,30	5,0±0,150
7	5,9±0,177	5,4±0,162	4,4±0,132
8	3,96±0,119	3,6±0,108	3,7±0,111
9	9,69±0,291	4,2±0,126	7,4±0,222

Згідно звітам, отриманим з лабораторій СПК за 9 місяців 2012 р., з використанням даного тест-набору було досліджено 87 638 зразків донорської крові. Показник діагностичної специфічності тест-системи “DIA-HIV-Ag/Ab” склав 99,7%.

Проведені дослідження продемонстрували високу якість розробленої тест-системи “DIA-HIV-Ag/Ab” та відповідність її діагностичних характеристик сучасним вимогам до ІФА-діагностикумів, що застосовуються для скринінгу донорської крові. Аналітична чутливість тест-системи при виявленні першого Міжнародного стандарту Аг (NIBSC) склала 1 МО/мл. За вимогами CTS (2009/108/EC) та Комісії Європейського Союзу від 3 лютого 2009 р., аналітична чутливість для СЕ-маркованих імуноферментних тест-систем з виявлення Міжнародного стандарту нативного Аг повинна складати не більше 2 МО/мл [4].

Аналітична чутливість тест-системи “DIA-HIV-Ag/Ab” з виявлення Контрольного зразка Аг склала 2,5 пкг/мл. При дослідженні тест-системи “DIA-HIV-Ag/Ab” з використанням панелі “Стандарт АГ(+) ВІЧ1 р24” (МБА) чутливість набору склала 20 пкг/мл. Вищевказані відмінності у чутливості тесту з виявлення Аг (2,5 та 20 пкг/мл), вірогідно обумовлені як відмінностями джерела Аг та ступеню очистки використаних стандартів, так і особливостями специфічності МКАТ до Аг, використаних в тест-системі. У паспортах до вищенаведених стандартів вказано, що білок р24 ВІЛ-1 (АВІ) виділено з культури клітин HUT78, інфікованих вірусом HIV-1ПІВ; очищено за допомогою імуноафінної хроматографії з використанням МКАТ до HIV-1ПІВ р24 та HPLC; ступінь чистоти препарату складає 95%. Поставляється у буфері PBS без додавання будь-яких інших білків, що дозволяє оцінити концентрацію та чистоту препарату. Стандарт Аг (МБА) є пулом з 10 зразків сироваток крові

донорів, у який внесено культуральний цільно-віріонний інактивованій Аг (штам ЕВК/ІРА-3) в різній концентрації. Відомості про очистку Аг не наведено. Концентрацію Аг у кожному зразку було розраховано калібруванням в ІФА відносно стандарту Аг фірми “Bio-Rad” (США). Істотні відмінності національних референс-препаратів Аг відзначили експерти ВОЗ при розробці першого Міжнародного стандарту Аг (АВІ) [5]. При кількісному оцінюванні вмісту першого Міжнародного стандарту р24 ВІЛ-1 відносно різних референс-антигенів р24 ВІЛ-1, виражених у пкг/мл (включених в якості калібраторів в 14 тест-системах різних виробників), було встановлено, що 1 МО/мл Міжнародного стандарту р24 ВІЛ-1 відповідає діапазону концентрацій різних стандартів від 2,4 пкг/мл до 26,9 пкг/мл. Такі відмінності роблять актуальним задачу коректного калібрування національних стандартів р24 ВІЛ-1 відносно першого Міжнародного стандарту, а також розробки єдиних стандартів для кожного субтипу ВІЛ.

В даній роботі було продемонстрована висока здатність тест-системи “DIA-HIV-Ag/Ab” визначати Аг до ВІЛ різних груп та субтипів (ВІЛ-1: А, В, С, Е, О, ВІЛ-2).

Параметр чутливості тест-системи при дослідженні зразків стандартних панелей та вибірки (837 зразків) нерозведених сироваток від ВІЛ-інфікованих пацієнтів, отриманих з медзакладів різних регіонів України, склав 100%. Відзначено, що тест-система “DIA-HIV-Ag/Ab” здатна виявляти у сироватці крові антитіла до ВІЛ-1 та ВІЛ-2 в низькій концентрації та з більш високими сигналами, ніж комерційні аналоги провідних світових виробників (табл. 8–10).

Здатність тест-системи “DIA-HIV-Ag/Ab” діагностувати ранню ВІЛ-інфекцію було перевірено за допомогою трьох сероконверсійних панелей — PRB 950, PRB 958, PRB 959 (ВВІ).

Показано, що розроблена нами тест-система в панелях PRB 950 та PRB 958 виявляє зразки позитивними на більш ранніх етапах захворювання, аніж її комерційні аналоги.

Розроблена нами тест-система продемонструвала високу специфічність. При дослідженнях в умовах підприємства “НБК “ДіапрофМед” специфічність склала 100% (2519 зразків); а в клінічних лабораторіях — 99,7% (87637 досліджень).

Слід відзначити високу стабільність та точність тест-системи “DIA-HIV-Ag/Ab”: показник міжсерійних відмінностей коефіцієнта позитивності для 12 випущених промислових серій тест-системи становив 5,87% (CV).

Таким чином, отримані результати показали, що розроблена нами високочутлива тест-система “DIA-HIV-Ag/Ab” для одночасного виявлення антитіл до ВІЛ1/2 та антигену р24 ВІЛ-1 за діагностичними показниками якості (чутливість та специфічність) відповідає сучасним Міжнародним вимогам до даного виду продукції та може бути використана в масштабних програмах проведення скринінгу донорської крові та підтвердження результатів досліджень на ВІЛ.

ЛІТЕРАТУРА

1. ВІЧ-інфекція / Інформ. бюл. № 36. — М.: Федеральний научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИДом, 2012. — www.hivrussia.org
2. ВІЛ-інфекція в Україні / Інформ. бюл. — К.: МОЗ, 2012. — № 38. — 37 с.
3. Іванська Н.В., Кислик О.М., Максименко О.В. та ін. Практичний посібник з імуноферментного аналізу / під ред. А.Л. Гураля та М.Я. Снівака. — К.: ДіапрофМед, ДМП “Полімед”, 2003. — 51 с.
4. COMMISSION DECISION of 3 February 2009, amending Decision 2002/364/EC on common technical specification for in vitro-diagnostic medical devices (notified under document number C(2009)565), text with EEA relevance, (2009/108/EC)// Official Journal of European Union. — 2009. — Vol. 10, № 2 — P. 34–49.
5. Garrett A.J., Heath A.B. Report of a collaborative study on proposed HIV-1 p24 antigen reference reagents // Expert committee on biological standardization, Geneva, 13–20 October, 1992. — P. 1–22.
6. WHO. UNAIDS. Global report. Global summary of the AIDS epidemic. www.unaids.org

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИГЕНА Р24 И АНТИТЕЛ К ВИЧ-1 И ВИЧ-2

Т.Ю. Трохимчук, Л.А. Ганова, В.А. Шевчук,
В.Г. Сердюк, С.В. Михалуп, Ю.И. Горлов, Н.Я. Спивак

На ЧАО “НПК “Діапроф-Мед” розроблена і введена в виробництво тест-система підвищеної чутливості для одночасного визначення в сировотці і плазмі крові антител к ВИЧ1/2 и антигена р24

ВИЧ-1. Аналитическая чувствительность тест-системы по выявлению Международного стандарта антигена р24 ВИЧ-1 (NIBSC, Великобритания) составила 1 МЕ/мл, по выявлению Контрольного образца антигена р24 ВИЧ-1 (ABI, США) — 2,5 пкг/мл, при использовании панели “Стандарт АГ(+) ВИЧ1 р24” (МБА, Россия) чувствительность набора составила 20 пкг/мл. Продемонстрирована высокая способность тест-системы “DIA-HIV-Ag/Ab” определять антитела к ВИЧ различных групп и субтипов (ВИЧ-1: А, В, С, Е, О, ВИЧ-2). Параметр чувствительности тест-системы составил 100%. Способность тест-системы “DIA-HIV-Ag/Ab” диагностировать раннюю ВИЧ-инфекцию была проверена на сероконверсионных панелях — PRB950, PRB958, PRB959 (BBI, США). Показано, что разработанная тест-система в панелях PRB 950 и PRB 958 выявляет образцы как позитивные на более ранних этапах заболевания, чем ее коммерческие аналоги. Параметр специфичности при испытаниях в условиях предприятия составил 100%, при испытании в клинических лабораториях — 99,7%. Показатель межсерийных различий коэффициента позитивности для 12 выпущенных промышленных серий тест-системы составил 5,87% (CV). Тест-система “DIA-HIV-Ag/Ab” отвечает современным Международным требованиям к данному виду продукции и может быть использована в масштабных программах проведения скрининга донорской крови и подтверждения результатов исследований на ВИЧ.

DIAGNOSTIC PERFORMANCE OF HIGHLY SENSITIVE IMMUNOASSAY FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF P24 ANTIGEN AND ANTIBODIES TO HIV-1 AND HIV-2

T.Yu. Trokhimchuk, L.A. Ganova, V.A. Shevchuk,
V.G. Serdiuk, S.V. Mikhalup, Yu.I. Gorlov, M.Ya. Spivak

The new highly sensitive ELISA test-kit “DIA-HIV-Ag/Ab” for simultaneous detection of p24 HIV-1 antigen and antibodies to HIV-1 and HIV-2 in human serum or plasma was developed in JSC “Diaproph-Med”. The analytical sensitivity of this immunoassay was 2,5 pkg/ml against native purified p24 protein (ABI, USA), 11U/ml against international WHO standard (NIBSC, Great Britain) and 20pkg/ml when panel “Standard AG(+) HIV1 p24” (MBU, Russia) was used. It was shown that “DIA-HIV-Ag/Ab” could detect different HIV group and subtype (HIV-1: A, B, C, E, O, HIV-2). The sensitivity of test-kit was 100% when different standard panel and undiluted sera from HIV infected patients were tested. To examine, whether “DIA-HIV-Ag/Ab” could reveal early HIV infection three seroconversion panels were used — PRB950, PRB958, PRB959 (BBI, USA). It was shown that developed ELISA kit detects infection earlier than commercial immunoassays of fourth generation when PRB950 and PRB958 were tested. Specificity of “DIA-HIV-Ag/Ab” was determined using donor blood collection as well as in clinical laboratories and amounted 100% and 99,7% respectively. Coefficient of interserial distinctions of positivity index for 12 manufactured series of test-kit was 5,87% (CV). Developed immunoassay “DIA-HIV-Ag/Ab” conforms to international requirements lodged to such kind of immunoassays and could be used for donor blood screening and verification of preliminary HIV testing.