

УДК 616-097

**РОЗРОБЛЕННЯ ТА АДАПТАЦІЯ ДО УМОВ МАСШТАБНОГО
ВИРОБНИЦТВА ІМУНОФЕРМЕНТНОЇ ТЕСТ-СИСТЕМИ
ПІДВИЩЕНОЇ ЧУТЛИВОСТІ ДЛЯ РАННЬОЇ
ДІАГНОСТИКИ ВІЛ-ІНФЕКЦІЇ**

Т. Ю. ТРОХИМЧУК, здобувач,

Л. О. ГАНОВА, кандидат біологічних наук,

В. Г. СЕРДЮК, науковий співробітник

ПрАТ НВК „Діапроф-Мед”

М. Я. СПІВАК, член.-кор. НАН України, доктор біологічних наук, професор

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України

E-mail: T.Trohymchuk@ukr.net

***Анотація.** Більш ніж 25 років проблема розповсюдження вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ) продовжує залишатися актуальною для всього світу. Проблема ранньої діагностики вірусу імунодефіциту людини може бути вирішена шляхом упровадження в лабораторну практику високочутливих діагностичних імуноферментних тест-систем (ІФА) 4-го покоління. Перевагою такої тест-системи є можливість одночасного виявлення в сироватці крові антигену р24 ВІЛ-1 і сумарних ВІЛ-специфічних антитіл (IgG, IgM, IgA), що дозволяє діагностувати інфекцію на ранніх етапах розвитку. Тест-систему сконструйовано на основі очищених рекомбінантних білків ВІЛ-1 і ВІЛ-2 та моноклональних антитіл- адаптована до масштабного виробництва. Проаналізовано показники інформативності імуноферментної тест-системи “DIA-HIV-Ag/Ab”, аналітична чутливість за стандартом АВІ склала 2.5 пг/мл, а за стандартом NIBSC – 1 МО/мл.*

***Ключові слова:** ВІЛ-інфекція, імуноферментний аналіз, МКАТ анти-р24, рекомбінантні антигени*

Актуальність. Упродовж останніх років в Україні складається несприятлива епідемічна ситуація відносно інфекції, викликаной вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ), яка стала однією з найважливіших і найактуальніших медико-соціальних проблем нашої країни [10]. За темпами розповсюдження ВІЛ-інфекції/СНІДу Україна посідає одне з перших місць

© Трохимчук Т. Ю., Ганова Л. О., Сердюк В. Г., Співак М. Я.

серед країн Європи [12]. За період 1987 – 2016 рр в Україні виявлено **503 413** позитивних результатів обстеження на ВІЛ за даними СЕМ (сероепідеміологічний моніторинг поширення ВІЛ), офіційно серед громадян України зареєстровано **297 424** випадки ВІЛ-інфекції, у тому числі **92 897** випадків захворювання на СНІД, та **41 710** випадків смерті від захворювань, зумовлених СНІДом. [10].

Після інфікування ВІЛ імунологічні і вірусологічні маркери з'являються в крові в наступній хронології: вірусна РНК, антиген (АГ) р24, АТ до ВІЛ-специфічних АГ. При інфікуванні протягом перших 1-2 тижнів відбувається реплікація вірусу. Під час цього так званого "eclipse" періоду в сироватці немає маркерів для детекції ВІЛ-інфекції. Початкову віремію можливо визначати через 10-12 днів після інфікування шляхом виявлення рибонуклеїнової кислоти РНК вірусу. Вірусний АГ р24 виявляється у крові пізніше РНК, приблизно на 11-13 день після інфекції. Концентрація р24 залишається високою і виявляється у хворого протягом півтора місяця після інфікування [3, 6, 8]. Часовий інтервал до того, як в сироватці з'являться АТ до ВІЛ-специфічних АГ називають «періодом сероконверсійного вікна». Цей період характеризується відсутністю вірус-специфічних АТ і явно вираженою віремією. Після появи в сироватці ВІЛ-специфічних АТ, віремія знижується, і, як наслідок, відбувається зменшення кількості АГ р24. Нарешті, на стадії СНІДу, коли імунна система тяжко пошкоджена, вірусна реплікація знову підвищується, досягаючи високого рівня продукції вірусу.

Рання діагностика ВІЛ/СНІДу є важливим заходом у системі охорони здоров'я. Останні наукові дослідження свідчать про те, що своєчасне виявлення ВІЛ-інфекції, початок антиретровірусної терапії (АРТ) можуть значно знизити швидкість розповсюдження ВІЛ/СНІДу і зменшити показники смертності від захворювання [5,12]. Тому розроблення діагностикумів для раннього виявлення ВІЛ-інфекції є актуальною задачею для сучасної медицини, біології і біотехнології.

© Трохимчук Т. Ю., Ганова Л. О., Сердюк В. Г., Співак М. Я.

Мета дослідження – розробка та створення високочутливої імуноферментної тест-системи для визначення ранніх антитіл ВІЛ і антигену р24 ВІЛ.

Матеріали та методи досліджень.

Матеріали

Стандарт р24 ВІЛ-1 (ABI, Advanced Biotechnologies, USA).

1-й Міжнародний стандарт антигену р24 ВІЛ-1 NIBSC (UK) – 100 МО/мл.

Сероконверсійні панелі Boston Biomedica Inc. (USA), сироватки крові від ВІЛ інфікованих – PRB- 927, PRB- 928.

Сироватки крові від ВІЛ-позитивних та ВІЛ-негативних осіб отримано з обласних станцій переливання крові України.

Отримання рекомбінантних поліпептидів – аналогів антигенів ВІЛ-1 та ВІЛ-2. Усі рекомбінантні поліпептиди-аналоги вірусних АГ ВІЛ накопичувались у клітинах штаму-продуценту у вигляді тілець включення.

Цикл відмивань тілець включення полягав у чергуванні операцій гомогенізації тілець включення на політроні та послідовному осадженні їх шляхом центрифугування при 11000 g протягом 25 хв при 10 °С. Потім осад тілець включення гомогенізували у розчині 20 мМ Трис-НСl, 1 мМ Na₂ЕДТА, рН 8,0. До отриманої суспензії порціями додавали сечовину до кінцевої концентрації 8 М та 2-меркаптоетанол до кінцевої концентрації 10 мМ протягом ночі. Після обробки на ультразвуковому дезінтеграторі УЗДН-А та центрифугування при 11000 g протягом 25хв при 10 °С до освітленого розчину білкового екстракту додавали 1/5 частину розчину насиченого сульфату амонію та залишали суспензію на 2 год. для формування осаду. Утворений осад збирали шляхом центрифугування, як описано вище. Очищення рекомбінантних поліпептидів Env1 та Env2 здійснювали методом іонообмінної хроматографії з використанням сорбенту DEAE-toyopearl (TOSOH, Японія) при навантаженні на сорбент 4-6 мг білку на 1 см³ сорбенту. Елюцію білку

© Трохимчук Т. Ю., Ганова Л. О., Сердюк В. Г., Співак М. Я.

проводили ступінчатою хроматографією з концентраціями хлориду натрію від 70 до 240 мМ.

Хроматографічне очищення рекомбінантних білків Trx-Env1 та Trx-Env2 здійснювали із застосуванням методів іммобілізованої метал-афінної хроматографії (IMAX) з використанням сорбенту IDA-toyoperl (TOSOH, Японія), попередньо активованим іонами нікелю згідно інструкції фірми-виробника. Елюцію поліпептидів Trx-Env1 і Trx-Env2 проводили способом ступінчатої хроматографії з концентраціями імідазолу від 80 до 250 мМ.

Одержання МКАТ проти АГ р24 ВІЛ-1. Для імунізації мишей лінії BALB/c віком 8-10 тижнів використовували комерційний нативний білок р24 ВІЛ-1 (ABI, USA). Тварин імунізували, вводячи 20 мкг білку в 20 мкл PBS ретельно перемішаного з 20 мкл повного ад'юванту Фрейнда. Ін'єкцію робили підшкірно в так звану "hook" ділянку задньої лапи миші. Через три тижні робили повторну підшкірну імунізацію в спину миші, ближче до хвоста. На 8-й, 15-й і 26-й день проводили перевірку наростання титру специфічних АТ. Для цього проводили імуноферментний аналіз на планшетах з іммобілізованим білком Gag1725 (ПрАТ «НВК«Діапроф-Мед»»), у складі якого присутній АГ р24 ВІЛ-1. Через вісім днів після останньої імунізації проводили зливання клітин. Для цього у миші видаляли пахові, підколінні, підшкірні і перикардальні лімфовузли, проводили дезінтеграцію лімфатичних вузлів і отриману в результаті цієї процедури суспензію клітин переносили в 50 мл пробірку. Клітини осаджували шляхом центрифугування при 1500 RPM протягом 5 хв. і двічі відмивали в холодному середовищі IMDM.

Клітини мієломи Sp2/0 розморожували і нарощували в базовому поживному середовищі (IMDM, 10 % ембріональної телячої сироватки, 100 одиниць ампіциліну, 100мкг/мл стрептаміцину) протягом 2-х пасажів. Перед зливанням клітини мієломи відбирали із флакона і проводили підрахунок. При гібридизації співвідношення лімфоцит : мієломна клітина повинно становити

© Трохимчук Т. Ю., Ганова Л. О., Сердюк В. Г., Співак М. Я.

5 : 1. Отже, необхідну кількість мієломних клітин відбирали із суспензії і тричі відмивали в теплому середовищі IMDM при 1500 RPM протягом 5 хв.

За день до соматичної гібридизації готували фідерний макрофагальний шар. Для цього мишу забивали, занурювали у 70 % спирт для знезараження і внутрішньочеревнево вводили 10 мл середовища IMDM. Через хвилину обережно забирали середовище із черевної порожнини і проводили центрифугування при 2000 RPM протягом 5 хв. Осад розводили у 30 мл базового середовища для культивування клітин. Макрофаги розсаджували в 96-лункові планшети по 100 мкл на лунку. Після відмивання, лімфоїдні і мієломні клітини змішували і осаджували шляхом центрифугування при 1500 RPM протягом 5 хв., обережно видаляли надосад, розбивали осад і переміщували пробірку на водяну баню. Після цього, протягом однієї хвилини, по краплям до клітин додавали розігрітий до 37 °C поліетиленгліколь (ПЕГ, Sigma) при постійному перемішуванні, а потім проводили центрифугування клітин при 1200 RPM протягом 5 хв. і двічі відмивали в середовищі IMDM у тому ж режимі. Клітини залишали в осаді на 40 хв. при 37 °C, потім їх перемішували, додавали до суспензії подвійну кількість середовища ГАТ і вносили в 96-лункові планшети з макрофагами по 100 мкл на лунку. Планшети із клітинами залишали на тиждень в CO₂ інкубаторі при 37 °C. У базовому поживному середовищі з додаванням ГАТ клітини вирощували протягом 2-х тижнів після чого ГАТ замінювали на ГТ.

Скринінг клонів. Приблизно через тиждень у лунках чітко видно гібридоми, які вже утворили клони. Для тестування супернатанту на присутність специфічних АТ було сконструйовано імуноферментну тест-систему. В якості твердої фази використовували полістиролові 96-лункові планшети PolySorp (Nunc), в лунки яких сорбували очищений рекомбінантний поліпептид Gag-1725 у карбонат-бікарбонатному буфері (рН 9,6). Досліджувані зразки культурального середовища інкубували в лунках імуносорбенту в розведенні 1 : 2 (50 мкл розчину для культурального середовища + 50 мкл

© Трохимчук Т. Ю., Ганова Л. О., Сердюк В. Г., Співак М. Я.

розчину для розведення зразків). Після інкубації утворені імунні комплекси виявляли за допомогою пероксидазного кон'югату на основі козячих поліклональних антитіл до Fab-фрагментів IgG миші (anti-mouse IgG (Fab-specific) peroxidase antibody produced in goat, Sigma). В якості позитивного контролю використовували очищені МКАТ відповідної специфічності. Як негативний контроль використовували базове поживне середовище.

Очищення МКАТ проводили за допомогою двостадійної афінної хроматографії з використанням протеїн А і протеїн G сефарози. На першому етапі асцитну рідину центрифугували при 3500 RPM протягом 20 хв., розводили в п'ять разів PBS рН 7,2-7,4, фільтрували через ацетат-целюлозні мембрани з діаметром пор 0,45 мкн і наносили самопливом на протеїн А сефарозу. Проскок наносили на протеїн G сефарозу. Після промивання носія PBS 7,2-7,4 проводили елюцію за допомогою 0.1М гліцинового буфера рН 2,7. Для нейтралізації кислого рН попередньо в посуд для елюції вносили 2М трис-буфер, рН 8,0 із розрахунку 1 мл нейтралізуючого буфера на 10 мл елюату. Після діалізу при 5 °С проти PBS рН 8,0 проводили вимірювання концентрації імуноглобулінів на спектрофотометрі при довжині хвилі 280 нм. Якість очистки МКАТ оцінювали за допомогою електрофорезу в 10 % ПААГ-SDS в редуруючих умовах за методом Леммлі [7].

Отримання кон'югатів рекомбінантних поліпептидів Trx-Env1 та Trx- Env2 з пероксидазою хрону (ПХ). Підготовку рекомбінантних поліпептидів проводили як описано вище. Наважку ПХ розчиняли в 0,1 М натрій фосфатному буфері, рН 7,2 до концентрації 10-20 мг/мл. До розчину ПХ додавали 0,1 мл водного розчину перйодату до кінцевої концентрації перйодату 8мМ. Інкубували 20 хв при кімнатній температурі у темряві. Відділяли окислену пероксидазу від перйодату на хроматографічній колонці з Sephadex G25.

До розчину окисленої ПХ додавали 1/50 об'ємну частину 0.2 М розчину карбонату натрію, рН 9,5 та змішували його з розчином рекомбінантного

© Трохимчук Т. Ю., Ганова Л. О., Сердюк В. Г., Співак М. Я.

поліпептиду у молярному співвідношенні пероксидаза : поліпептид – 2 : 1. Проводили інкубацію протягом двох годин при кімнатній температурі без доступу світла. Наприкінці інкубації в суміш вносили 1/20 об'ємну частину 0,2 М розчину натрію борогідриду (NaBH_4) та витримували 2 год. на холоді в темряві.

Кон'югат діалізували на холоді протягом 20-24 год. і центрифугували як описано вище. Концентрацію пероксидази в кон'югаті визначали спектрофотометричним методом, обчислюючи за формулою: $C_{\text{пхмг/мл}} = A_{403} \times 0,44$. Потім додавали стабілізуючий розчин та зберігали отриманий кон'югат при температурі 2-8 °С .

Отримання біотинільованих кон'югатів МКАТ 631Е4. Розчин МКАТ з концентрацією 2-3 мг/мл діалізували на холоді у три зміни проти 20-кратних об'ємів 0,1М бікарбонату натрію, рН 8,5-9,5 протягом 20-24 год. Після цього центрифугували при 13000 RPM протягом 10 хв. Надалі працювали з супернатантом. Концентрацію МКАТ визначали на спектрофотометрі при довжині хвилі 280 нм.

Біотинілювання проводили, додаючи до МКАТ 50-кратний молярний надлишок реагенту Bi-NHS (Sigma), розчиненого в N,N-діметилформаміді (ДМФА). Інкубували протягом 2 год. при кімнатній температурі. Для видалення хімічних речовин і незв'язаного біотину проводили діаліз кон'югату на холоді протягом 20-24 годин у три зміни проти 20-кратних об'ємів 0,1М фосфатного буферного розчину, рН 7,0-7,2. Потім проводили центрифугування при 10000-13000 RPM 5-10 хв. Надалі працювали із супернатантом. Концентрацію МКАТ обчислювали як описано вище. Після цього додавали стабілізуючий розчин та зберігали кон'югант при +2-8 °С.

Результати дослідження та їх обговорення. Отримання рекомбінантних поліпептидів. Рекомбінантні поліпептиди – аналоги антигенів Env1 ВІЛ-1 та Env2 ВІЛ-2 було сконструйовано в рEX або рET експресійній системі шляхом клонування специфічних послідовностей у

© Трохимчук Т. Ю., Ганова Л. О., Сердюк В. Г., Співак М. Я.

відповідні вектори. Електрофоретичний аналіз хроматографічного очищення рекомбінантного поліпептиду Env1 представлено на рисунку 1, рекомбінантного поліпептиду Env2 на рисунку 2 і рекомбінантних поліпептидів Trx-Env1 та Trx-Env2 на рисунку 3.

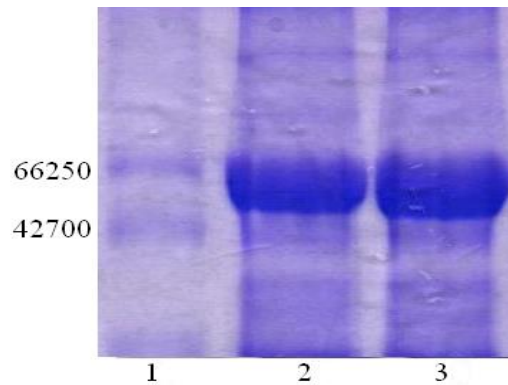


Рис. 1. Електрофоретичний аналіз хроматографічної очищення рекомбінантного поліпептиду Env1: 1 – маркери молекулярної ваги (Merck, Germany); 2 – розчинені тільця включення; 3 – цільовий білок Env1 після хроматографічної очистки.

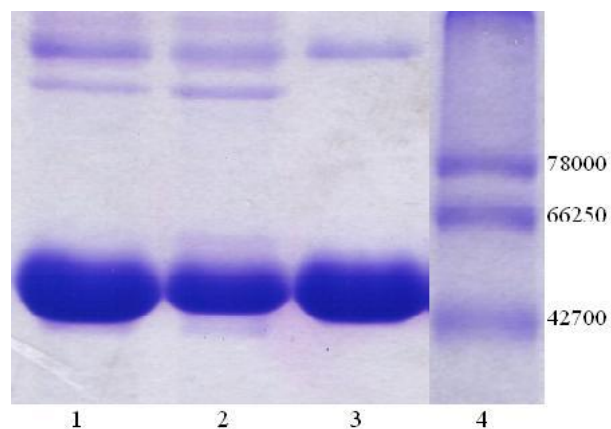


Рис. 2. Електрофоретичний аналіз хроматографічного очищення рекомбінантного білку Env2: 1 – розчинені тільця включення; 2 – фракція білку, що не зв'язується з сорбентом; 3 – цільовий білок Env2 після хроматографічної очистки; 4 – маркери молекулярної ваги (Merck, Germany).

© Трохимчук Т. Ю., Ганова Л. О., Сердюк В. Г., Співак М. Я.

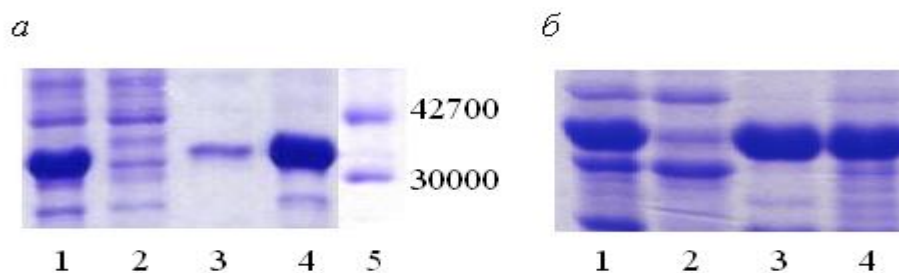


Рис. 3. Електрофоретичний аналіз хроматографічного очищення рекомбінантного поліпептиду Trx-Env1 (а) і Trx-Env2 (б): 1 – розчинені тільця-включення; 2 – фракція білку, що не зв'язується із сорбентом; 3 – фракція білку при промиванні буфером, який вміщує 80 мМ імідазолу; 4 – цільовий білок при елюції буферним розчином, який вміщує 250 мМ імідазолу; 5 – маркери молекулярної ваги (Merck, Germany).

Отримані рекомбінантні поліпептиди Env1 та Env2 було використано для приготування імуносорбенту для тест-системи “DIA-HIV-Ag/Ab”, а рекомбінантні білки Trx-Env1 та Trx-Env2 – для виготовлення кон'югатів із ПХ.

Отримання моноклональних антитіл. Після двостадійної афінної хроматографії з використанням протеїн А і протеїн G сефарози, якість очистки МКАТ оцінювали за допомогою електрофорезу в 10 % ПААГ-SDS в редуруючих умовах за методом Леммлі (рис. 4).

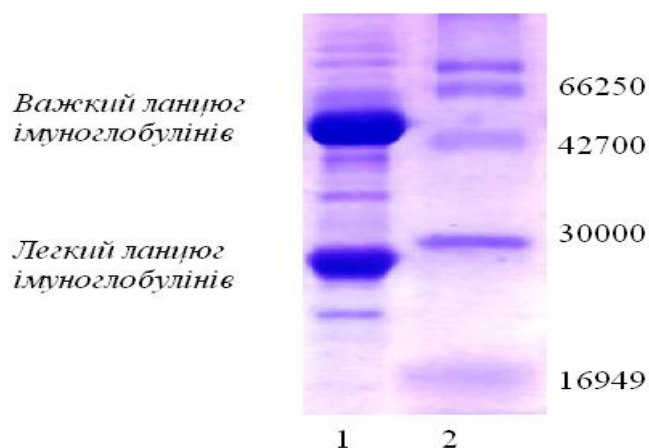


Рис. 4. Електрофоретичний аналіз хроматографічного очищення МКАТ E4

Як видно з рисунку 4 у препараті МКАТ при електрофорезі в редууючих умовах виявляються лише тяжкі (приблизно 50 kDa) і легкі (приблизно 25 kDa) ланцюги імуноглобулінів, інші домішки не виявляються.

© Трохимчук Т. Ю., Ганова Л. О., Сердюк В. Г., Співак М. Я.

Вибір оптимальної сорбційної дози та буферу для МКАТ до р24 ВІЛ-1.

МКАТ до р24 ВІЛ-1 сорбували в концентраціях від 1 до 4 мкг/мл в карбонатному буфері (КБ) і карбонат-бікарбонатному буфері (КБК) використовуючи як контролі антиген р24 (АВІ) в концентраціях від 5 до 80 пкг/мл та 30 негативних сироваток. Оцінку оптимальної сорбційної дози здійснювали за співвідношенням оптичної густини (ОГ) стандарту р24 ВІЛ-1 АВІ до середнього значення суми ОГ негативних сироваток (табл. 1).

1. Вибір оптимальної сорбційної дози та розчину для МКАТ до р24 ВІЛ-1

Зразки	Значення ОГ/ГЗ					
	КБ			КБК		
	4мкг/мл	2мкг/мл	1мкг/мл	4мкг/мл	2мкг/мл	1мкг/мл
80пкг/мл	14,7	12,1	11,2	15,1	11,4	10,2
40пкг/мл	8,6	8,0	6,9	8,9	7,8	6,8
20пкг/мл	6,8	6,1	5,4	6,9	6,0	5,0
10пкг/мл	3,6	2,8	2,0	3,7	2,7	1,9
5пкг/мл	2,0	1,5	1,1	2,2	1,4	0,9
середнє негативних сироваток	0,4	0,4	0,3	0,4	0,4	0,3

Як свідчать дані таблиці 1, оптимальною сорбційною дозою МКАТ є 4 мкг/мл в КБК.

Оскільки в тест-системі 4 покоління визначають не тільки АГ р24 ВІЛ, а й АТ до ВІЛ в сорбційну суміш крім МКАТ були додані антигени Env1 і Env2. МКАТ до р24 ВІЛ-1 сорбували як описано вище, АГ Env1 – 3; 1,5 та 0,7 мкг/мл, а АГ Env2 – 1,5 та 0,7 мкг/мл в КБК. Оцінку придатності сорбційної суміші здійснювали на позитивних до ВІЛ-1 сироватках №№ 97, 99, 100, 302, 305; до ВІЛ-2 – №№ 2, 3, антигені р24 АВІ в концентраціях 5 і 10 пг/мл та негативних сироватках (табл. 2).

© Трохимчук Т. Ю., Ганова Л. О., Сердюк В. Г., Співак М. Я.

2. Визначення оптимальної концентрації Env1 і Env2 у сорбційній суміші

Досліджувані матеріали	Значення ОГ/ГЗ				
	Env1			Env2	
	3мкг/мл	1,5мкг/мл	0,7мкг/мл	1,5мкг/мл	0,7мкг/мл
97	6,4	6,2	5,7	6,0	6,1
99	7,1	7,4	7,0	7,1	7,3
100	4,6	5,0	4,0	4,4	4,9
302	8,2	8,6	8,1	8,1	8,5
305	10,1	10,2	9,1	10,0	10,3
№2	4,3	4,8	4,0	4,2	4,3
№3	2,1	2,3	2,3	2,4	2,3
10пкг/мл	3,6	3,8	3,7	3,5	3,7
5пкг/мл	2,0	1,9	1,9	1,7	2,0
сер. негат.	0,4	0,4	0,3	0,8	0,4

За даними, наведеними в таблиці 2, видно, що значення антигену р24 АВІ не змінюється при різних концентраціях поліпептидів. Для білка Env1 концентрація склала 1,5 мкг/мл, а для білка Env2 – 0,7 мкг/мл.

Визначення чутливості створеної тест-системи “DIA-HIV Ag/Ab” по АГ р24 ВІЛ-1 здійснювали, використовуючи стандарти АВІ та NIBSC (табл. 3) і сероконверсійні панелі PRB-927 та PRB-928 (табл. 4).

3. Чутливість розробленої тест-системи по антигену р24 ВІЛ-1 на стандартах АВІ та NIBSC

Стандарт АВІ			Стандарт NIBSC		
Концентрація, пг/мл	ОГ	ОГ/ГЗ	Концентрація, МО/мл	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

Як свідчать дані таблиці 3, чутливість розробленої тест-системи за стандартом АВІ становила 2,5 пкг/мл, а за стандартом NIBSC – 1 МО.

4. Чутливість тест-системи при перевірці її на сероконверсійних панелях PRB-927 та PRB-928

Зразки	День забору крові	Тест-системи			
		Abbot HIV1/2	Org,Tek HIV	Abbot HIV Ag	DIA HIV-AgAT
		ОГ/ГЗ			
PRB 927-1	0	0,2	0,4	0,6	0,1
PRB 927-2	28	14,9	0,5	22,7	15,7
PRB 927-3	33	16,8	0,7	10,2	23,3
PRB 927-4	35	16,8	1,0	2,6	23,3
PRB 927-5	40	16,8	3,5	1,3	19,7
PRB 928-1	0	0,2	0,4	0,6	0,2
PRB 928-2	111	7,8	0,5	22,7	9,1
PRB 928-3	120	15,1	2,9	2,2	17,3
PRB 928-4	125	15,6	4,9	1,8	20,2
PRB 928-5	130	16,4	6,1	1,0	21,8

Як видно з даних табл. 4, в панелях PRB-927 і PRB-928 тільки перші сироватки не були виявлені позитивними, так як в них, згідно з паспортними даними, відсутні специфічні антитіла, антиген p24 і РНК-ВІЛ. Останні сироватки в складі панелей (№ 2-5 PRB-927, № 2-5 PRB-928 виявлені як позитивні з достатньо високими показниками ОГ/ГЗ .

Висновки та перспективи подальших досліджень. Тест-система „DIA-HIV-AgAb”, яка розроблена на основі рекомбінантних білків ВІЛ і МКАТ до p24 ВІЛ-1 може одночасно в одному аналізі виявляти як АГ ВІЛ, так і АТ проти ВІЛ-, ВІЛ-2. Відзначна особливість набору полягає у використанні додаткової ампліфікації сигналу за рахунок введення біотинтирамін-стрептавідинового підсилювання, що дозволяє збільшити чутливість тест-системи і виявляти до 2,5 пг/мл антигену p24 на 3-5 днів раніше, ніж при використанні інших наборів для діагностики ВІЛ-інфекції.

Список літератури

1. [Allen E. M.](#) Comments on the Recent Clinical Guidance Statement on HIV Screening / [E. M. Allen](#), [R. J. Kohlwes](#) // *Annals of Internal Med.* – 2009. – V. 151, No 4. – P. 286.
2. Buckland R.M. Strong signals from streptavidin-biotin // *Nature.* – 1986. – V. 320, N 6062. – P.557-558.
3. Diagnostic, Monitoring and Resistance Laboratory Tests for HIV // *HIV Clinical Resource.* – 2016. – P. 1-23.
4. Erlich P. The theory and practice of chemotherapy / P. Erlich // *Folia Serologica.* – 2011. – № 7. – P. 697-714.
5. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. / Fiebig E.W., Wright D.J., Rawal B.D., Garrett P.E., Schumacher R.T., Peddada L., Heldebrant C., Smith R., Conrad A., Kleinman S.H., Busch M.P. // *AIDS.* – 2003.– Vol. 17, N 13. – P. 1871-9.
6. Laboratory testing for the diagnosis of HIV infection // *CDC. National Center for HIV/AIDS.* – 2013. – P. 234.
7. Magdeldin S. Gel Electrophoresis –Principles and Basics // *InTech Press.* – 2012. – P. 366.
8. Nakane P.K., Kawaoi A.A. New method of conjugation // *J. Histochem.Cytochem.* – 1974. – V. 22. – P. 1084-1091.
9. Solid phase guide. / editor: Rowell V. – Denmark: Nunc A/S. – 1999. – P.177.
10. The HIV infection in Ukraine. *Informacijnij bjuleten.* – 2016. – N 46, Kyiv: MOZ Ukrainy, P.7-14.
11. Вивчення сорбційної здатності полістирольних планшетів, які використовуються в імуноферментному аналізі / Бенаїн Л. В., В. Ю. Грідіна, О. Н. Пантелеєва та ін. // *ЖМЭИ.* – № 9. – 1989. – С. 86-89.
12. ВИЧ-Диагноз и заболеваемость СПИДом в Германии: доклад о развитии в 2014 году в Институте им. Роберта Коха // *Эпидемиологический Бюллетень.* – 2015. – № 27. – С. 239-260.

References

1. Allen E. M., Kohlwes R J. (2009). Comments on the Recent Clinical Guidance Statement on HIV Screening // *Annals of Internal Med.* 151(4). 286.
2. Buckland R.M. (1986) Strong signals from streptavidin-biotin // *Nature.* 320, (6062). 557-558.
3. Diagnostic, Monitoring and Resistance Laboratory Tests for HIV (2016) // Available at: [http: hivguidelines.org](http://hivguidelines.org).
4. Erlich P. (2011) The theory and practice of chemotherapy // *Folia Serologica.* 7. 697-714.

© Трохимчук Т. Ю., Ганова Л. О., Сердюк В. Г., Співак М. Я.

5. Fiebig E.W., Wright D.J., Rawal B.D., Garrett P.E., Schumacher R.T., Peddada L., Heldebrant C., Smith R., Conrad A., Kleinman S.H., Busch M.P. (2003) Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. AIDS. 17:13,1871-9.
6. Laboratory testing for the diagnosis of HIV infection (2013) // CDC. National Center for HIV/AIDS. 234.
7. Magdeldin S. (2012) Gel Electrophoresis –Principles and Basics // InTech Press. 366.
8. Nakane P.K., Kawaoi A.A. (1974) New method of conjugation // J.Histochem.Cytochem. 22. 1084-1091.
9. Rowell V. ed. (1999) Solid phase guide. // Denmark: Nunc A/S. 177.
10. The HIV infection in Ukraine. Informacijnij bjuletен (2016). // Kyiv: MOZ Ukrainy. 46.7-14.
11. Benain L. V., Hridina V. Iu., Pantelieieva O. N. ta in (1989). Vyvchennia sorbtsiinoi zdatnosti polistyrolnykh planshetiv, yaki vykorystovuiutsia v imunofermentnomu analizi [Study of the sorption capacity of polystyrene tablets used in the enzyme-linked immunosorbent assay.] // ZhMЭУ.9. 86-89.
12. Эpidemjologhycheskyi Biulletен. VYCh-Dyahnoz y zabolevaemost SPYDom v Hermanyu - doklad o razvytyu v 2014 hodu v Ynstytute ym. Roberta Kokha [HIV Diagnosis and the incidence of AIDS in Germany: a report on development in 2014 at the Robert Koch Institute.] (2015). 27, 239-260.

РАЗРАБОТКА И АДАПТАЦИЯ К УСЛОВИЯМ МАСШТАБНОГО ПРОИЗВОДСТВА ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ПОВЫШЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

Т. Ю. Трохимчук, Л. А. Ганова, В. Г. Сердюк, Н. Я. Спивак

Аннотация. Больше 25 лет проблема распространения вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) продолжает оставаться актуальной для всего мира. Проблема ранней диагностики вируса иммунодефицита человека может быть решена путем внедрения в лабораторную практику высокочувствительных диагностических иммуноферментных тест-систем 4-го поколения. Преимуществом этой тест-системы является возможность одновременного определения в сыворотке крови антигена р24 ВИЧ-1 и суммарных ВИЧ-специфических антител (IgG, IgM, IgA), что позволяет выявлять инфекцию на ранних этапах развития. ИФА тест-система четвертого поколения сконструирована на основе очищенных рекомбинантных белков ВИЧ-1, ВИЧ-2 и моноклональных антител, которая адаптирована к масштабному производству. Проанализированы показатели информативности иммуноферментной тест-системы “DIA-HIV-Ag/Ab”,

© Трохимчук Т. Ю., Ганова Л. О., Сердюк В. Г., Співак М. Я.

аналитическая чувствительность по стандарту AVI составила 2.5 нг/мл, а по стандарту NIBSC – 1 МЕ/мл.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, иммуноферментный анализ, МКАТ анти-p24, рекомбинантные антигены

DEVELOPMENT AND ADAPTATION TO LARGE-SCALE PRODUCTION IMMUNOENZYMATIC TEST SYSTEM INCREASED SENSITIVITY FOR EARLY DIAGNOSIS OF HIV INFECTION

T.Y. Trokhymchuk, L.A. Ganova, V.G. Serduk, M.Y. Spivak

Abstract. *More than 25 years the problem of the spread of the human immunodeficiency virus (HIV) continues to be relevant for the whole world. The problem of early diagnosis of the human immunodeficiency virus can be solved by introducing into the laboratory practice the 4th generation high-sensitivity diagnostic immunoenzyme test systems. The advantage of this combination analysis is the possibility of simultaneous detection in the blood serum of HIV-1 p24 antigen and HIV-specific focal antibodies (IgG, IgM, IgA), which allows detecting infection in the early stages of development. The fourth generation ELISA test system is constructed on the basis of purified recombinant proteins HIV-1, HIV-2 and monoclonal antibodies, which is adapted to large-scale production. Indicators of informativity of the enzyme immunoassay system "DIA-HIV-Ag / Ab" were analyzed, the analytical sensitivity according to the AVI standard was 2.5 pg / ml, and according to the NIBSC standard - 1 IU/ml.*

Keywords: *HIV infection, enzyme immunoassay, MAB anti-p24, recombinant antigens*