УДК 616.98.578.828-078

Т.Ю. Трохимчук[1], Л.О. Ганова[1], Н.В. Іванська[1], О.В. Максименок[2], С.Л. Рибалко[2]

ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ВІЛ ЗА МІЖНАРОДНИМИ СТАНДАРТАМИ І В КУЛЬТУРАХ КЛІТИН, ЗАРАЖЕНИХ ВІЛ

[1] *Приватне акціонерне товариство, Наукова виробнича компанія "Діапроф-Мед",*
[2] *ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського НАМНУ"*

Боротьба з ВІЛ-інфекцією та синдромом набутого імунного дефіциту (СНІД) в Україні давно вже отримала статус загальнодержавної пріоритетної програми. Проте поширення ВІЛ-інфекції/СНІДу триває. Тому не зникає потреба в діагностичних засобах та розробці методів виявлення ВІЛ-інфекції. Лабораторна діагностика ВІЛ-інфекції — це один з найважливіших та найдосконаліших елементів Всесвітньої програми боротьби зі СНІДом, опрацьованої ВООЗ.

Основні методи діагностики ВІЛ-інфекції базуються на імунологічних принципах, тобто, на селективному, зворотному і не ковалентному зв'язуванні антигенів (АГ) з антитілами (АТ). Ці методи використовуються для визначення наявності і кількості антигенів або антитіл в біологічних рідинах. Наявні комплекси АГ з АТ можуть бути виявлені різними способами з використанням мітки з ферментів або інших хімічних сполук. Одним з таких способів є імунохімічний метод ELISA — ензим зв'язаний імуносорбентний аналіз або імуноферментний аналіз (ІФА).

Цей метод був вперше запропонований в 1971 р. Engval і Perelman [4]. В подальшому ІФА все більш удосконалювався з метою підвищення чутливості і специфічності методу [5–8].

Існує декілька варіантів постановки ІФА для виявлення АТ і АГ (прямий, непрямий, конкурентний, "сандвіч"), але в усіх них використовують кон'югат ферменту зі специфічними або антивидовими АТ чи АГ та проявник (суміш субстрату з хромогеном). В результаті ферментативної реакції з субстратом за допомогою хромогену реакційна суміш забарвлюється, а інтенсивність кольору прямо пропорційна кількості досліджуваних АТ або АГ у зразку [2, 9–11].

Метою даною роботи стало визначення чутливості тест-системи "DIA-HIV-Ag/AT " за Міжнародними стандартами і в культурах клітин, заражених ВІЛ.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Стандарти: 1-й Інтернаціональний референтний реагент ВІЛ-р24 АГ (HIV-1 p24 antigen), виділений з обробленого детергентом ВІЛ-1 (NIBSC, Великобританія).

Контрольний зразок ВІЛ-1 p24 (HIV IIIB p24 gag) — очищений нативний білок, 100 мкг/мл (ABi, США). ВІЛ (референтний штам ВІЛ-1RF) отримано з продукуючої культури МТ4/ВІІІ ЛБК (Т-лейкоцити людини) з музею вірусів Інституту вірусології ім. Д.І. Івановського (Москва, РФ). Вірус зберігається при температурі мінус 70°С в Інституті епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського.

Культури перещеплюваних клітин. Суспензійна культура перещеплюваних лімфобластоїдних Т-клітин людини МТ4 та Jurkat отримані з банку клітин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології НАН України. Культивуються в атмосфері 5% CO_2 в пластикових флаконах (Nunc) в середовищі RPMI-1640 з 2 мМ глютаміну і прогрітою при температурі 37°С 10% ембріональною телячою сироваткою. Густина клітин $2–5 \cdot 10^5$ клітин/мл.

Стандартна панель PRB 801, що містить сироватку крові людини з ВІЛ в різній концентрації виробництва Boston Biomedica Inc. (США).

Тест-системи: тест-система імуноферментна "GENSCREEN HIV1 Ag assay" для виявлення АГ ВІЛ-1 (BioRad); тест-система "DIA-HIV-Ag/AT" з підвищеною чутливістю (НВК "Діапроф-Мед").

Розчини при проведенні ІФА: для сорбції АГ, промивання планшетів, розведення сироваток і кон'югатів, розчин біотинтираміну, субстратний буфер та хромоген тетраметилбензидин (ТМБ), а також стоп-реагент виробництва НВК "Діапроф-Мед".

Рекомбінантні білки Env1 і Env2 — аналоги оболонкових поліпептидів gp120, gp41 ВІЛ-1 та gp105, gp36 ВІЛ-2, виробництва НВК "Діапроф-Мед".

Моноклональні антитіла (МКАТ) — мишачі антитіла проти антигену р24 (ВІЛ-1), виробництва НВК "Діапроф-Мед".

Кон'югати: мишачі біотинільовані МКАТ проти антигену р24 (ВІЛ-1); рекомбінантні білки

Env-1 і Env-2 ВІЛ, мічені пероксидазою (ПХ), стрептавідин, мічений ПХ, отримано на ПраТ НВК "Діапроф-Мед".

Статистична обробка результатів досліджень [1, 3]. Для встановлення значимості отриманих показників і визначення достовірності відмінностей між ними використано значення середньої арифметичної трьох повторів показників оптичної густини (ОГ) зразків, отриманих в ІФА, стандартної похибки та середньоквадратичного відхилення. Розраховували середні значення ОГ для 3-х лунок кожного розведення сироваток та величину квадратичного відхилення (α) за стандартною формулою:

$$\sigma = \pm\frac{\sum d^2}{(n-1)}, \quad d = X_i - \bar{X},$$

де d — різниця між окремими показниками і середньою арифметичною величиною ($X_i - \bar{X}$); n — кількість досліджуваних сироваток; X_i — окрема одиниця (оптична густина кожної сироватки — ОГ); $\bar{X}$ — середнє арифметичне оптичної густини досліджуваних сироваток; Σ — знак суми (сума квадратів відхилень) з використанням комп'ютерної програми Microsoft Office Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При створенні тест-системи для визначення АГ та АТ ВІЛ-1 і ВІЛ-2 використано модифікацію ІФА, в якій на твердий носій (полістироловий планшет) сорбували АГ Env1 та Env2 — аналоги оболонкових поліпептидів gp120 і gp41 ВІЛ-1 та gp105 і gp36 ВІЛ-2, також МКАТ до p24 ВІЛ-1, в оптимальній концентрації, а як кон'югати застосовано рекомбінантні білки Env-1 і Env-2, мічені ПХ та біотинільовані АТ до p24. Для виявлення біотину в систему додано стрептавідин з ПХ, а для посилення оптичного сигналу — біотинтирамін. Реакцію проявляли ТМБ.

Були відпрацьовані всі ключові моменти багатоетапної реакції — сорбування АГ і МКАТ в лунки планшету; промивка; взаємодія АГ і АТ з досліджуваною сироваткою та з ферментміченим кон'югатом; умови підсилення оптичного сигналу; проявлення та облік результатів ферментативної реакції. Усі ці моменти особливо важливі для посилення специфічності та чутливості тест-системи, а також для зручності виконання робіт при її використанні.

При створенні тест-системи підвищеної чутливості для виявлення АТ ВІЛ -1,2 та АГ p24 (ВІЛ-1) були підібрані найбільш ефективні компоненти, а саме:

імуносорбент — полістироловий 96-лунковий стриповий планшет для імунологічних реакцій Maxisorp фірми Nunc з сорбованими на ньому рекомбінантними білками Env-1, Env-2 ВІЛ 1/2 та МКАТ проти p24 ВІЛ-1;

негативний контроль — інактивована сироватка крові людини, яка не містить АТ до ВІЛ, вірусів гепатиту В і С, а також поверхневий АГ вірусу гепатиту В (HBsAg);

позитивний контроль — інактивована сироватка крові людини, яка містить АТ до ВІЛ і не містить АТ до вірусів гепатиту В і С, а також HBsAg;

кон'югат № 1 — біотинільовані МКАТ проти p24 ВІЛ-1 та рекомбінантні білки Env-1, Env-2 кон'юговані з ПХ у стабілізаційному розчині;

кон'югати № 2 і 3 — стрептавідин, кон'югований з ПХ у стабілізаційному розчині (в різних розведеннях);

розчин біотинтираміну;

розчин хромогену ТМБ;

розчин для промивання планшетів, розведення кон'югату №1 і кон'югатів № 2 і 3 та стопреагент.

Постановка імуноферментного аналізу на тест-системі "DIA-HIV-Ag/AT":

- тест-набір призначений для скринінгових і підтверджуючих досліджень сироватки та плазми крові людини на наявність корового АГ ВІЛ (p24) та сумарних АТ (IgG, IgM, IgA) до ВІЛ 1/2 методом твердофазного ІФА.

Одночасно в одному аналізі можна виявляти як АГ ВІЛ, так і АТ проти нього. Особливість набору полягає в використанні додаткового підсилювання сигналу за рахунок введення біотинтирамін-стрептавідину, що дозволяє збільшити чутливість діагностики.

При внесенні в лунки планшету зразків сироваток інфікованої крові АГ p24 зв'язується одночасно зі специфічними МКАТ на твердій фазі і з моноклональними біотинільованими АТ проти p24 в складі кон'югату № 1. Специфічні АТ до ВІЛ в досліджуваному зразку зв'язуються як з рекомбінантними АГ Env1 і Env2, сорбованими на твердій фазі, так і з АГ в складі пероксидазного кон'югату № 1, утворюючи комплекси АГ-АТ.

Імунні комплекси специфічних АТ проти p24 з АГ p24 виявляються пероксидазним кон'югатом стрептавідину (кон'югат № 2). Ампліфікація сигналу здійснюється за рахунок введення в

систему біотинтираміну і додатковою інкубацією з пероксидазним кон'югатом стрептавідину (кон'югат № 3). Після поєднання АТ з АГ і створення комплексів, їх виявляють за допомогою проявника, який в результаті ферментної реакції з субстратом і хромогеном ТМБ змінює колір розчину. Пероксидазну реакцію зупиняють, додаючи стоп-реагент і вимірюють оптичну густину при довжині хвилі 450/620 нм.

Облік результатів аналізу. Розрахунки проводили додаючи константну величину 0,1 до середнього значення негативного контролю (ГЗ= ср.К.⁻ +0,1). Результат тестування вважається негативним, якщо значення ОГ досліджуваної сироватки менше значення ГЗ.

Апробація тест-системи "DIA-HIV Ag/AT"для визначення антигену p24 ВІЛ з використанням Міжнародних стандартів p24 ВІЛ.

Для визначення АГ p24 ВІЛ стандартний зразок ABI, який містить — очищений нативний білок p24 gag ВІЛ IIIB, розводили в концентрації від 40 до 2,5 пкг/мл. Стандарт NIBSC — 1-ий Інтернаціональний референтний реагент ВІЛ-p24 АГ, виділений з обробленого детергентом ВІЛ-1, містить АГ p24, концентрація якого виражена в Міжнародних одиницях (МО, mlU/мл), його розводили двократно починаючи з 8 МО. Дані чутливості тест-системи наведені в табл. 1.

Як свідчать дані табл. 1, чутливість розробленої тест-системи за стандартом ABI становила 2,5 пкг/мл, а за стандартом NIBSC — 1 МО антигену p24 ВІЛ.

Наступним етапом було дослідити можливість тест-системи "DIA-HIV Ag/AT" в порівнянні з тест-системою "GENSCREEN HIV1 Ag" виявляти вірус в культурі перещеплюваних клітин. Для цього були використані культура MT4, що продукує вірус, і культура клітин Jurkat, заражена ВІЛ в різній концентрацііі (табл. 2).

Як свідчать дані табл. 2, тест-система "DIA-HIV Ag/AT" виявляє ВІЛ в перещеплюваних культурах клітин до розведення 105 також, як і тест-система "GENSCREEN HIV1 Ag".

Для визначення чутливості розробленої тест-системи по здатності виявляти антиген p24 ВІЛ, використана також стандартна панель PRA 801, яка містить серійні розведення лізату ВІЛ з культури клітин. Ця панель рекомендована ВООЗ як калібрувальна панель для визначення чутливості імуноферментних тест-систем для діагностики ВІЛ. В табл. 3 наведені дані перевірки чутливості тест-системи по АГ p24 ВІЛ на панелі PRA 801, розраховуючи чутливість за трьома стандартами: Стандарту ВООЗ, в МО; Стандарту DuPont в пкг/мл p24 ВІЛ і Стандарту Sanofi в пкг/мл p24 ВІЛ.

Таблиця 1

Чутливість розробленої тест-системи по антигену p24 ВІЛ-1 на стандартах ABI та NIBSC

Стандарт ABI			Стандарт NIBSC		
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±0,10	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

Таблиця 2

Виявлення ВІЛ в культурі клітин за допомогою тест-системи "DIA-HIV Ag/AT"

Титр вірусу, lg	MT4				Jurkat			
	DIA-HIV Ag/AT		GENSCREEN HIV1 Ag		DIA-HIV Ag/AT		GENSCREEN HIV1 Ag	
	ОГ	ОГ/ГЗ	ОГ	ОГ/ГЗ	ОГ	ОГ/ГЗ	ОГ	ОГ/ГЗ
Нативний	>4		>4		>4		>4	
10^1	3,824	22,5	3,551	31,70	3,900	22,90	3,513	31,30
10^2	1,518	8,93	1,657	13,90	1,831	11,10	1,842	16,40
10^3	0,986	5,80	1,020	9,12	1,241	7,30	0,717	6,40
10^4	0,212	1,24	0,262	2,33	0,211	1,24	0,209	1,86
10^5	0,182	1,10	0,116	1,03	0,173	1,01	0,109	0,97

Таблиця 3

Результати перевірки чутливості за антигеном p24 тест-системи "DIA-HIV-Ag/AT" на панелі PRA 801

Зразки	Стандарт ВООЗ, mIU/мл ВІЛ p24	Стандарт DuPont, пкг/мл ВІЛ p24	Стандарт Sanofi, пкг/мл ВІЛ p24	DIA-HIV-Ag/AT, ОГ/ГЗ
PRA801-01	>2000	>200	>200	19,2
PRA801-02	1600	140	>200	14,6
PRA801-03	970	85	>200	10,3
PRA801-04	483	42	145	5,7
PRA801-05	250	21	75	3,8
PRA801-06	125	10	38	2,1
PRA801-07	60	5	16	1,2
PRA801-08	25	2	8	0,6
PRA801-09	<10	<2	<2	0,4
PRA801-10	негативний	негативний	негативний	0,3

Як видно з даних представлених в табл. 3, розроблена тест-система визначає АГ p24 в пробах 1-7, що відповідає значенням від >2000 до 60 mIU/мл за стандартом ВООЗ, від >200 до 5 пкг/мл за стандартом DuPont і від >200 до 16 пкг/мл за стандартом Sanofi.

Таким чином, тест-система "DIA-HIV-AgAT", яка розроблена на основі рекомбінантних білків ВІЛ і моноклональних АТ до p24 ВІЛ може виявляти АГ ВІЛ в концентрації 2,5 пкг/мл по Міжнародному стандарту. Особливість набору полягає в використанні додаткової ампліфікації сигналу за рахунок введення біотинтирамін-стрептавідинового підсилювання, що дозволяє збільшити чутливість тест-системи і виявляти до 2,5 пкг/мл АГ p24 по стандарту АВІ.

Використовуючи розроблену тест-систему "DIA-HIV-AgAT" підвищеної чутливості можливо встановити ранню стадію інфекційного процесу, що підвищує безпеку донорської крові у відношенні ВІЛ.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Бабич П.М. Застосування сучасних статистичних методів у практиці клінічних досліджень (повідомлення третє). Відношення шансів: поняття, обчислення та інтерпретація / П.М. Бабич, А.В. Губенко, С.М. Лапач // Укр. Мед. Часопис. — 2005. — № 2 (46). — С. 1670–1675.*
2. *Практичний посібник з імуноферментного аналізу / Н.В. Іванська, О.М. Кислих, О.В. Максименок та ін. / під ред. А.Л. Гураля та М.Я. Співака. — К.: Діапроф-Мед, ДМП "Полімед", 2003. — 51 с.*
3. *Статистичний аналіз результатів біологічних випробувань і кількісних визначень. В кн. Державна Фармакопея України. Перше видання. доп. 1, Харьків, 2004. — С. 151–186.*
4. *Engvall E., Perlman P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. / E. Engvall, P. Perlman // Immunochemistry. — 1971. — Vol. 8. — P. 871–874.*
5. *Edwards R. Immunoassay: an Introduction // Heinmann Medical Books, London. — 1985. — 234 p.*
6. *ELISA from Wikipedia. The free encyclopedia. — [Електронний ресурс] http: // en.wikipedia.org/wiki/ELISA.*
7. *Growther J.R. The ELISA guidebook. 2nd ed. / J.R. Growther // A Humana Press. — 2009. — XV. — 566 p.*
8. *Handbook of Immunochemistry / ed. P. Esser. — Danmark, Nunc Band Producs. — 2000. — 243 p.*
9. *Нго Г.Г. Иммуноферментный анализ / Г.Г. Нго, Г.М. Ленкофф. — М.: Мир, 1988. — 446 с.*
10. *Immunoassays. A practical approach / ed. J.P. Gosling. — USA, Oxford: University press, 2000. — 293 p.*
11. *Voller A. A guide with abstracts of microplate applications / A. Voller, D.E. Bidwell, A. Bartlett. — Dynatech Europe: Guernsey, 1979. — 183 p.*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИЧ ПО МЕЖДУНАРОДНЫМ СТАНДАРТАМ И В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК, ЗАРАЖЕННЫХ ВИЧ

Т.Ю. Трохимчук, Л.О. Ганова, Н.В. Іванська, О.В. Максименок, С.Л. Рибалко

Создана тест-система повышенной чуствительности для одновременного обнаружения в одном анализе антигена p24 ВИЧ и антител к нему. Особенность набора состоит в использовании дополнительной амплификации сигнала за счет введения биотинтираминстрептавидинового усиления, что позволяет увеличить чуствительность тест-системы и выявлять до 2,5 пкг/мл антигена p24.

DETERMINING THE SENSITIVITY OF A TEST-SYSTEM FOR THE HIV DIAGNOSIS BY INTERNATIONAL STANDARDS AND IN CELL CULTURES INFECTED WITH HIV

T.Y. Trokhimchuk, L.O. Ganova, N.V. Ivanska, O.V. Maksimenok, S.L. Rybalko

Test-system with increased sensitivity for simultaneous detection of HIV p24 antigen and HIV antibodies was established. Additional signal amplification by introducing biotintiramin-streptavidin amplification, which increased the sensitivity up to 2.5 pg / ml of p24 antigen, was the feature of the test systems.