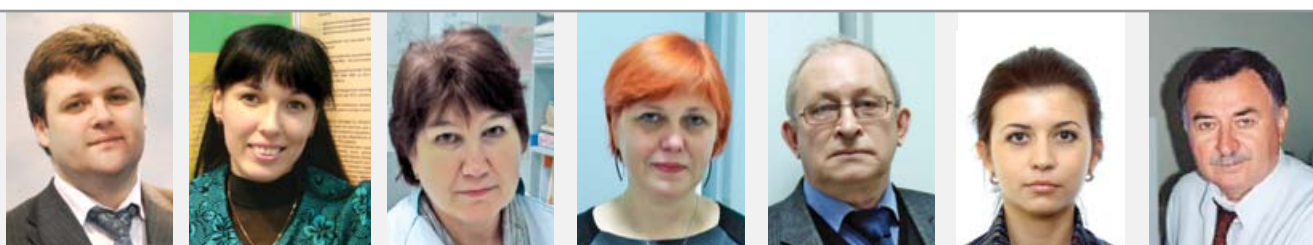


# Диагностическая характеристика высокочувствительной тест-системы для одновременного выявления антигена P24 ВИЧ-1 и антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2

Т. Ю. Трохимчук, Л. А. Ганова, С. В. Михалап, Ю. И. Горлов, В. А. Шевчук, И. А. Шепелин, К. А. Шепелин, Н. Я. Спивак

ЧАО «НПК «Диапроф-Мед», Киев, Украина  
ООО «Эпидбиомед-диагностика», Москва



К. А. Шепелин

Т. Ю. Трохимчук

Л. А. Ганова

С. В. Михалап

Ю. И. Горлов

В. А. Шевчук

Н. Я. Спивак

Заболевание ВИЧ/СПИДа приобрело характер глобальной катастрофы. По данным UNAIDS, опубликованным в 2011 г. [1], в мире около 33,3 млн человек инфицировано ВИЧ, среди них 15,9 млн женщин и 2,5 млн детей до 15 лет.

По данным Федерального научно-методического центра по профилактике и борьбе со СПИДом [2], в России на 31.12.2011 г. насчитывалось 650 165 человек, у которых выявлены антитела к ВИЧ, 17 881 человек больны СПИДом, 86 673 больных умерло от СПИДа. За 2011 г. численность больных ВИЧ по сравнению с 2010 г. увеличилась на 9,6 %, а число новых случаев ВИЧ-инфекции выросло на 7 %. На 30.05.2012 г. зарегистрировано 665 590 ВИЧ-инфицированных, из них детей 5 939, среди которых 4 195 заражены от матерей. В Российской Федерации ВИЧ-инфекция поражает преимущественно молодое население. У 66 % эта инфекция диагностирована в возрасте до 30 лет.

Эти статистические данные свидетельствуют об ухудшении эпидемической ситуации по ВИЧ-инфекции в стране. Сохраняется высокий уровень заболеваемости ВИЧ, и не снижаются темпы прироста новых случаев заражения, увеличивается общее число ВИЧ-инфицированных и число смертей от этого заболевания.

Тенденция возрастания числа ВИЧ-инфицированных регистрируется также и в Украине. В 2011 г. в стране зарегистрировано 21 204 новых случая ВИЧ-инфекции, 9 199 человек умерли от СПИДа. По ВИЧ заболеванию на 1.07.2012 г. зарегистрировано 124 222 человека и прирост вновь заболевших составил 1,35 %. При сохранении такой тенденции эпидемического процесса в Украине существует риск, что в 2014 г. 479–820 тыс. человек в Украине будет жить с ВИЧ [3].

Аналогичная неблагоприятная тенденция в развитии эпидемии ВИЧ/СПИДа характерна и для большинства других государств постсовет-

ского пространства. В отчетах Объединенной программы ООН по СПИДу (ЮНЭЙДС) сообщается о пугающей скорости распространения ВИЧ-инфекции в странах Восточной Европы и Центральной Азии, где число людей, живущих с ВИЧ, составляет 1,5 млн человек, что в 3,5 раза выше, чем в 2011 году (410 000) и более чем в 10 раз выше, чем в 1991 году, причем 90 % инфицированных приходится на Украину и Россию.

В связи с этим, своевременное выявление ВИЧ-инфекции, внедрение новых и усовершенствование существующих методов диагностики остается основным направлением при проведении мероприятий по снижению распространения данного заболевания.

При скрининговых обследованиях населения на ВИЧ-инфекцию используют в основном серологические методы, обычно иммуноферментный анализ (ИФА). За последние 30 лет иммуноферментные тест-системы эволюционировали от диагностикумов, скон-

струированных в формате непрямого ИФА с использованием сначала лигандных антигенов ВИЧ (1-е поколение тест-систем), затем рекомбинантных белков (2-е поколение тест-систем), до «сендвич»-вариантов диагностических систем 3-го и 4-го поколений. В тест-системах 3-го и 4-го поколений рекомбинантные полипептиды используются не только в составе иммуносорбента (твердой фазы), но и конъюгата, что позволило выявлять суммарные антитела разных классов (IgG, IgM, IgA) и сократило период сероконверсионного окна. Тест-системы 4-го поколения (комбинированные тесты) позволяют обнаруживать в исследуемых образцах не только специфические антитела (АТ), но и антиген р24 ВИЧ-1 (АГ) посредством введения в систему моноклональных антител (МКАТ) к белку р24 ВИЧ-1 [4]. Такая конфигурация тест-системы повысила ее чувствительность и позволила выявлять ВИЧ в более ранние сроки, когда антитела к вирусу еще отсутствуют.

Анализ результатов тестирования коммерческих ВИЧ-сероконверсионных панелей сывороток производства Boston Biomedica Inc. и ZertoMetrix Corp. (США) различными тест-системами показывает, что чувствительность комбинированных ИФА-тестов можно сопоставить с данным параметром ПЦР анализа. Вследствие этого в последние годы комбинированные тест-системы стали широко применяться при скрининговых исследованиях донорской крови для выявления маркеров ВИЧ-инфекции.

Широкое использование комбинированных тестов в службе крови диктует необходимость их дальнейшего совершенствования. Разработчики и фирмы-производители постоянно исследуют новые подходы дальнейшего увеличения параметров чувствительности и специфичности комбинированных тестов, повышения их качественных характеристик.

В 2011 г. на предприятии ЧАО НПК «Диапроф Мед» (Киев, Украина) была разработана высокочувствительная иммуноферментная тест-система DIA-HIV Ag/Ab 4-го поколения для одновременного выявления в сыворотке и плазме крови

человека антигена р24 ВИЧ-1 и антител (классов IgA, IgG, IgM) к ВИЧ-1 и ВИЧ-2. Цель данной работы состояла в изучении диагностических характеристик разработанной тест-системы.

#### Материалы и методы

Для исследования использованы нижеперечисленные материалы:

- положительные сыворотки от ВИЧ-инфицированных больных (837 образцов), полученных из областных центров СПИДа Украины;
- отрицательные на ВИЧ сыворотки доноров из областных станций переливания крови (2 487 образцов);
- 1-й международный стандарт антигена р24 ВИЧ-1 (HIV-1 p24 antigen) (NIBSC, Великобритания);
- контрольный образец антигена р24 ВИЧ-1 (HIV ШВ р24 gag) — очищенный вирусный белок (АВІ, США);
- 1-я международная референс-панель 02/210 (1-st International reference panel for anti-HIV), содержащая образцы плазмы крови с антителами к разным субтипам и группам ВИЧ (NIBSC, Великобритания);
- «Стандарт АГ (+) ВИЧ-1 р24 МБА» — панель сывороток крови человека, содержащих антиген р24 ВИЧ-1 в различных концентрациях (от 0,2 до 200 пкг/мл). Набор предназначен для оценки качества иммуноферментных тест-систем, используемых для выявления антигена р24 ВИЧ-1 (ООО «МедБиоАльянс», Россия);
- «Стандарт АТ (+) ВИЧ-1 МБА» — панель сывороток крови, содержащих антитела к ВИЧ-1 в различных концентрациях (ООО «МедБиоАльянс», Россия). Панель предназначена для оценки качества ИФА тест-систем;
- «Стандарт АТ (+) ВИЧ-2 МБА» — панель сывороток крови, содержащих антитела к ВИЧ-2 в различных концентрациях (ООО «МедБиоАльянс», Россия). Панель предназначена для оценки качества ИФА тест-систем;
- «Стандарт АТ (-) ВИЧ МБА» — панель сывороток крови, не содержащих антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2

(ООО «МедБиоАльянс», Россия). Панель предназначена для оценки качества ИФА тест-систем;

- сероконверсионные панели сывороток от ВИЧ-инфицированных пациентов — PRB 950, PRB 958, PRB 959 (ВВІ, США);
- панель сывороток от ВИЧ-инфицированных пациентов, содержащих антитела к ВИЧ в низких титрах — PRA 203 (ВВІ, США);
- стандартная панель сывороток «СПП-ВІЛ 1/2», образцы которой содержат антитела к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 в различных концентрациях (ЧАО НПК «Диапроф Мед»). Зарегистрирована в Украине, предназначена для оценки качества ИФА тест-систем;
- панель сывороток от ВИЧ-инфицированных пациентов, содержащая антиген р24 в разных титрах и антитела к ВИЧ — PRA 203 (ВВІ, США).

#### Статистическая обработка результатов

Для установления достоверности полученных данных использованы показатели среднего арифметического результатов трех повторов анализа исследуемых образцов в ИФА, стандартной ошибки и среднеквадратичного отклонения.

#### Результаты и обсуждение

Нами разработана тест-система повышенной чувствительности DIA-HIV-Ag/Ab 4-го поколения, предназначенная для скрининговых и подтверждающих исследований сывороток и плазмы крови человека на наличие антигена р24 ВИЧ-1 и суммарных антител (IgG, IgM, IgA) к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 методом иммуноферментного анализа.

Отличительной особенностью новой модификации тест-системы является использование сочетания полноразмерных и укороченных рекомбинантных и синтетических ВИЧ-специфических антигенных конструкций в составе иммуносорбента и иммуноферментного конъюгата, а также введение мощной системы биотин-стрептавидинового усиления специфического сигнала. Антиген р24 ВИЧ-1 из исследуемого образца

Таблица 1

Определение аналитической чувствительности тест-системы DIA-HIV Ag/Ab по выявлению антигена р24 ВИЧ-1 с использованием стандартов ABI и NIBSC

Стандарт ABI			Стандарт NIBSC		
Концентрация, пкг/мл	ОП	ОП/ГЗ	Концентрация, МЕ/мл	ОП	ОП/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

Примечание: ОП — оптическая плотность, ОП/ГЗ — соотношение оптической плотности к граничному значению, МЕ — международные единицы.

Таблица 2

Определение аналитической чувствительности тест-системы DIA-HIV Ag/Ab на панели «Стандарт АГ (+) ВИЧ-1 р24 МБА»

«Стандарт АГ (+) ВИЧ-1 р24 МБА»					
№ образца (концентрация р-24 ВИЧ-1)	ОП	ОП/ГЗ	№ образца (концентрация р-24 ВИЧ-1)	ОП	ОП/ГЗ
1 (200 пкг/мл)	1,212 ± 0,036	8,2 ± 0,25	6 (5 пкг/мл)	0,097 ± 0,03	0,6 ± 0,02
2 (100 пкг/мл)	0,631 ± 0,019	4,3 ± 0,13	7 (2,5 пкг/мл)	0,069 ± 0,02	0,4 ± 0,01
3 (50 пкг/мл)	0,389 ± 0,012	2,6 ± 0,08	8 (1 пкг/мл)	0,047 ± 0,01	0,3 ± 0,01
4 (20 пкг/мл)	0,195 ± 0,006	1,3 ± 0,04	9 (0,5 пкг/мл)	0,048 ± 0,01	0,3 ± 0,01
5 (10 пкг/мл)	0,13 ± 0,004	0,9 ± 0,03	10 (0,2 пкг/мл)	0,057 ± 0,01	0,4 ± 0,01

Таблица 3

Результаты тестирования панели сывороток 02/210 (NIBSC) в тест-системе DIA-HIV Ag/Ab

№ образца панели	АТ к субтипам и группам ВИЧ	Результаты	
		ОП	ОП/ГЗ
1	Анти-ВИЧ-1 субтип А группа М	3,387 ± 0,10	23,0 ± 0,69
2	Анти-ВИЧ-1 субтип В группа М	3,565 ± 0,11	24,2 ± 0,72
3	Анти-ВИЧ-1 субтип С группа М	3,319 ± 0,10	22,5 ± 0,67
4	Анти-ВИЧ-1 субтип Е группа М	3,233 ± 0,09	21,9 ± 0,66
5	Анти-ВИЧ-1 группа О	1,098 ± 0,03	7,5 ± 0,22
6	Анти-ВИЧ-2	3,195 ± 0,09	21,7 ± 0,65
7	Отрицательный контроль	0,063 ± 0,002	0,42 ± 0,012

Таблица 4

Исследование чувствительности тест-системы DIA-HIV Ag/Ab на панели сывороток «Стандарт АГ (+) ВИЧ-1 МБА»

№ образца панели	Результаты		№ образца панели	Результаты	
	ОП	ОП/ГЗ		ОП	ОП/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

связывается с моноклональными АТ к р24 ВИЧ-1 в составе иммуносорбента и биотинилированного конъюгата. Специфические АТ взаимодействуют с антигенами Е<sub>пв</sub>-1 и Е<sub>пв</sub>-2 иммуносорбента и биотинилированных конъюгатов. Образовавшиеся иммунные комплексы АГ-АТ выявляют пероксидазным конъюгатом стрептавидина. Проявляют ферментативную реакцию однокомпонентным ТМБ.

Аналитическую чувствительность созданной тест-системы определяли с использованием 1-го международно-го стандарта р24 ВИЧ-1 (NIBSC), контрольного образца р24 ВИЧ-1 (ABI) (табл. 1) и зарегистрированной в России стандартной панели сывороток, содержащих различные концентрации антигена р24 ВИЧ-1 (табл. 2).

По данным табл. 1, аналитическая чувствительность разработанной тест-системы по выявлению стандарта р24 ВИЧ-1 (ABI, США) составила 2,5 пкг/мл, международного стандарта р24 ВИЧ-1 (NIBSC) — 1 МЕ/мл.

В табл. 2 приведены данные по оценке аналитической чувствительности тест-системы DIA-HIV Ag/Ab на панели «Стандарт АГ (+) ВИЧ-1 р24 МБА», состоящей из десяти сывороток с различной концентрацией антигена р24 ВИЧ-1.

По данным табл. 2, тест-система определяет положительными образцы №№ 1–4, то есть аналитическая чувствительность тест-системы по антигену р24 ВИЧ-1 составляет 20 пкг/мл.

Следующим этапом определения чувствительности разработанной тест-системы была проверка ее на 1-й международной референс-панели сывороток с антителами к ВИЧ (NIBSC), которая включает шесть образцов, содержащих антигена к различным группам и субтипам ВИЧ. Результаты тестирования представлены в табл. 3.

Полученные результаты показали, что тест-система DIA-HIV Ag/Ab выявляет АТ к субтипам А, В, С и Е ВИЧ-1 группы М, АТ к ВИЧ-1 группы О и ВИЧ-2 с высокими значениями соотношения ОП/ГЗ.

Результаты исследования параметра чувствительности разработанной тест-системы на панели «Стандарт АГ (+) ВИЧ-1 МБА», состоящей из сыво-

роток с АТ к ВИЧ-1 в различных концентрациях, представлены в табл. 4.

Согласно полученным данным, все образцы панели сывороток с АТ к ВИЧ выявлены положительными с высоким соотношением ОП/ГЗ (от 21,1 до 23,1). Аналогично выяв-

ляются положительными все восемь образцов панели сывороток «Стандарт АГ (+) ВИЧ-2 МБА», содержащих АТ к ВИЧ-2 в различных концентрациях (данные не представлены).

Для определения способности тест-системы DIA-HIV Ag/Ab диагно-

**Таблица 5**  
Тестирование сероконверсионной панели сывороток PRB 950 в тест-системе DIA-HIV Ag/Ab

Образцы панели	Тест-системы, ОП/ГЗ				
	День забора крови	Abbot HIV1/2	Organon Teknika HIV	Abbot 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

Примечание. Данные по чувствительности тест-систем Abbott HIV1/2, Organon Teknika HIV, Abbott HIV Ag приведены из паспортных данных панели.

**Таблица 6**  
Тестирование сероконверсионной панели сывороток PRB 958 в тест-системе DIA-HIV-Ag/Ab

Образцы панели	Тест-системы, ОП/ГЗ				
	День забора крови	Abbot HIV1/2	Organon Teknika HIV	Abbot 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

**Таблица 7**  
Тестирование сероконверсионной панели сывороток PRB 959 в тест-системе DIA-HIV-Ag/Ab

Образцы панели	Тест-системы, ОП/ГЗ				
	День забора крови	Abbot 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

стировать раннюю ВИЧ-инфекцию нами использованы сероконверсионные панели PRB 950, PRB 958, PRB 959 (BBI, США), состоящие из сывороток крови от ВИЧ-инфицированных пациентов, взятых в разные сроки после заражения.

В табл. 5 приведены результаты исследования в тест-системе DIA-HIV Ag/Ab панели PRB 950, состоящей из четырех сывороток, взятых от ВИЧ-инфицированного пациента в разные сроки (0, 18, 21 и 28 день забора крови).

Согласно паспорта на панель, тест-система Abbott HIV Ag выявляет положительными образцы №№ 3 и 4, тест-система Abbott HIV1/2 только № 4, тест-система Organon Teknika HIV не определяет ни один из образцов

панели положительным. Тест-система DIA-HIV-Ag/Ab определяет положительными образцы №№ 2, 3 и 4.

В табл. 6 показаны результаты исследования в тест-системе DIA-HIV-Ag/Ab сероконверсионной панели PRB 958, состоящей из шести сывороток от ВИЧ-инфицированного пациента, взятых с различными интервалами времени: 0, 2, 7, 9, 15 и 17 день.

Согласно паспортным данным, в образцах №№ 1 и 2 специфические АТ к ВИЧ и антиген р24 ВИЧ-1 отсутствуют. Тест-система DIA-HIV-Ag/Ab определяет положительными образцы панели, начиная с третьего (седьмой день после первого забора крови). Тест-система Abbott HIV Ag определяет положительными образцы панели, начиная с четвертого,

остальные тест-системы, начиная с пятого и шестого образцов.

В табл. 7 приведены результаты тестирования сероконверсионной панели PRB 959, которая содержит семь сывороток, полученных от ВИЧ-инфицированного пациента, взятых с различными интервалами (от 0 до 26 дня).

В панели PRB 959 только первая сыворотка (959-1) определена отрицательной во всех тест-системах. В ней не выявлены специфические антитела, антиген р24 ВИЧ-1 и РНК-ВИЧ. Все остальные образцы панели в тест-системе DIA-HIV-Ag/Ab определены положительными с высокими значениями соотношения ОП/ГЗ.

Параметр чувствительности разработанной тест-системы был исследован также на стандартной панели HIV p24 Antigen Mixed Titer Performance Panel PRA 203 (BBI). Панель включает сыворотки от ВИЧ-инфицированных пациентов, содержащих антитела к ВИЧ и антиген р24 ВИЧ-1 в различных концентрациях. Образцы №№ 9 и 19 являются отрицательными. Результаты тестирования данной панели приведены в табл. 8.

Как видно из полученных данных, все 18 положительных образцов панели в тест-системе DIA-HIV-Ag/Ab определены положительными, а образцы №№ 9 и 19 отрицательными.

Результаты исследования способности тест-системы DIA-HIV-Ag/Ab выявлять антитела к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 в сравнении с ее коммерческими аналогами ведущих мировых производителей (далее обозначенных как тест-система № 1 и № 2) представлены в табл. 9. Для тестирования использовали зарегистрированную в Украине стандартную панель «СПП-ВЛ1/2» из 20 ВИЧ-положительных сывороток.

Тест-система DIA-HIV-Ag/Ab и диагностикум сравнения № 1 все образцы панели с антителами к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 определяют положительными, тогда как тест-система № 2 не выявляет две сыворотки с антителами к ВИЧ-2.

Для оценки параметра чувствительности разработанной тест-

Таблица 8

Тестирование панели сывороток PRA 203 в тест-системе DIA-HIV-Ag/Ab

системы DIA-HIV-Ag/Ab были протестированы 837 неразведенных сывороток от ВИЧ-инфицированных пациентов. Все сыворотки в тест-системе DIA-HIV-Ag/Ab определены положительными. В девяти образцах антитела к ВИЧ наблюдались в низких концентрациях (табл. 10). Это подтверждалось тем, что при разведении этих сывороток в 10 и 100 раз величина ОП/ГЗ резко уменьшалась и становилась ниже уровня граничного значения (ГЗ).

Как видно из представленных данных, тест-система DIA-HIV-Ag/Ab определяет все девять исследуемых сывороток положительными, однако соотношение ОП/ГЗ при этом невысокое (от 1,4 до 7,4). Аналогичные результаты получены при тестировании сывороток в тест-системе № 2, тогда как в тест-системе № 1 три сыворотки из девяти определяются отрицательными («ложноотрицательные» результаты).

Параметр специфичности разработанной тест-системы DIA-HIV-Ag/Ab определяли с использованием стандартных панелей отрицательных сывороток: «СПН-ВІІ1/2» (ЧАО НПК «Диапроф Мед») из 12 образцов и «Стандарт АТ (-) ВИЧ-МБА» (ООО «МедБиоАльянс», Россия) из 20 сывороток. Кроме этого, на базе нашего предприятия в тест-системе DIA-HIV-Ag/Ab были протестированы 2 487 донорских сывороток, полученных из различных СПК Украины, «ложноположительных» результатов не наблюдалось.

Таким образом, по результатам анализа в лабораториях предприятия значительной выборки донорских сывороток и образцов стандартных панелей, не содержащих специфических антител к ВИЧ и антигена р24 ВИЧ, параметр специфичности тест-системы DIA-HIV-Ag/Ab составил 100%.

В 2012 г. разработанная нами тест-система DIA-HIV-Ag/Ab была поставлена в учреждения службы крови Украины. По отчетам из лабораторий СПК за девять месяцев 2012 г. в данной тест-системе исследовано 87 638 образцов донорской крови. Показатель ее диагностической специфичности составил 99,7%.

Образцы панели	Тест-системы, ОП/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

Таблица 9

Тестирование стандартной панели сывороток «СПН-ВІІ1/2» в тест-системе DIA-HIV-Ag/Ab в сравнении с ее коммерческими аналогами

Образцы панели	Тест-системы, ОП/ГЗ		
	№ 1	№ 2	DIA-HIV Ag/Ab
1	17,3 ± 0,451	11,1 ± 0,735	25,1 ± 0,553
2	17,6 ± 0,194	11,2 ± 0,391	22,0 ± 0,66
3	17,3 ± 0,572	11,2 ± 0,572	24,7 ± 0,441
4	17,4 ± 0,269	11,1 ± 0,419	23,9 ± 0,717
5	4,8 ± 0,539	11,6 ± 0,361	22,8 ± 0,484
6	6,1 ± 0,629	10,0 ± 0,337	22,5 ± 0,675
7	7,7 ± 0,310	10,6 ± 0,429	22,8 ± 0,684
8	13,4 ± 0,726	11,4 ± 0,751	22,2 ± 0,466
9	16,8 ± 0,592	11,6 ± 0,492	23,4 ± 0,702
10	17,6 ± 0,664	11,2 ± 0,631	22,9 ± 0,687
11	16,3 ± 0,492	11,2 ± 0,581	23,3 ± 0,499
12	17,1 ± 0,391	11,2 ± 0,371	25,6 ± 0,568
13	17,1 ± 0,731	11,5 ± 0,582	23,2 ± 0,696
14	18,7 ± 0,428	10,2 ± 0,681	23,8 ± 0,514
15	5,7 ± 0,661	10,9 ± 0,374	23,4 ± 0,702
16	9,2 ± 0,429	11,4 ± 0,691	24,6 ± 0,638
17	11,3 ± 0,753	10,4 ± 0,417	23,7 ± 0,311
18	16,1 ± 0,361	10,6 ± 0,257	22,9 ± 0,687
19	17,0 ± 0,427	0,5 ± 0,009	22,1 ± 0,538
20	15,6 ± 0,337	0,4 ± 0,007	21,2 ± 0,476

Проведенные исследования продемонстрировали высокое качество разработанной тест-системы DIA-HIV-Ag/Ab и соответствие ее диагностических характеристик современным требованиям для ИФА-диагностикумов, применяемых в службе крови. Аналитическая чувствительность тест-системы по выявлению международного стандарта

антигена р24 ВИЧ-1 (NIBSC, Великобритания) составила 1 МЕ/мл. По требованиям CTS (2009/108/EC) комиссии Европейского союза от 3 февраля 2009 г., аналитическая чувствительность для SE-маркированных иммуноферментных тест-систем по выявлению международного стандарта ан-

Таблица 10

Результаты тестирования неразведенных сывороток от ВИЧ-инфицированных пациентов, содержащих АТ к ВИЧ в низких концентрациях, в тест-системе DIA-HIV-Ag/Ab и ее коммерческих аналогах

№ сыворотки	Тест-системы, ОП/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

тигена p24 ВИЧ-1 должна составлять не более 2 МЕ/мл [5]. Аналитическая чувствительность тест-системы DIA-HIV-Ag/Ab по антигену p24 ВИЧ-1 (АВІ, США) составила 2,5 пкг/мл. При тестировании панели Стандарт АГ (+) ВИЧ1 p24 (МБА, Россия) чувствительность была 20 пкг/мл. Вышеуказанные различия в чувствительности теста по антигену p24 ВИЧ-1 (2,5 и 20 пкг/мл) обусловлены, по-видимому, как различиями источника и степени очистки используемых стандартов, так и особенностями специфичности используемых в тест-системе МКАТ к антигену p24 ВИЧ-1. В паспортах на вышеуказанные стандарты указано, что белок p24 ВИЧ-1 (АВІ, США) выделен из культуры клеток HUT78, инфицированных вирусом HIV-1/IIIB, очищен иммуноафинной хроматографией и HPLC, степень чистоты составляет 95%. Поставляется в буфере PBS без добавлений каких-либо белков, что позволяет оценить концентрацию и чистоту препарата. Стандарт антигена p24 ВИЧ-1 (МБА, Россия) представляет собой набор из десяти образцов сыворотки донора, в которые внесен культуральный цельновирионный инактивированный антиген p24 ВИЧ-1 (штамм ЭВК/ИРА-3) в различных концентрациях. Сведения об очистке антигена не приведены. Концентрация антигена в каждом образце рассчитана калибровкой в ИФА относительно стандарта антигена p24 ВИЧ-1 фирмы Bio-Rad (США). Значительные различия национальных референс-препаратов антигена p24 ВИЧ-1 отметили эксперты ВОЗ при разработке 1-го международного стандарта

p24 ВИЧ-1 [6]. При количественной оценке содержания международного стандарта p24 ВИЧ-1 относительно различных референс-антигенов p24 ВИЧ-1, выраженных в пкг/мл (включенных в качестве калибраторов в 14 тест-систем различных производителей), было установлено, что 1 МЕ/мл международного стандарта p24 ВИЧ-1 соответствует диапазону концентраций различных стандартов от 2,4 пкг/мл до 26,9 пкг/мл. Такие различия делают актуальным задачу корректной калибровки национальных стандартов p24 ВИЧ-1 относительно международного стандарта, а также разработки единых стандартов для каждого субтипа ВИЧ.

В данной работе продемонстрирована высокая способность тест-системы DIA-HIVAg/Ab определять антитела к ВИЧ различных групп и субтипов (ВИЧ-1: А, В, С, Е, О, ВИЧ-2).

Параметр чувствительности тест-системы при тестировании образцов стандартных панелей и большой выборки (837 образцов) неразведенных сывороток от ВИЧ-инфицированных пациентов, полученных из медучреждений, составил 100%. Отмечено, что тест-система DIA-HIVAg/Ab способна выявлять в сыворотках антитела к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 в низкой концентрации с более высокими сигналами, чем коммерческие аналоги ведущих мировых производителей (см. табл. 8, 9, 10).

Способность тест-системы DIA-HIVAg/Ab диагностировать раннюю ВИЧ-инфекцию была проверена на трех сероконверсионных панелях: PRB 950, PRB 958, PRB 959 (ВВІ, США). Показано, что тест-система в панелях PRB 950 и PRB 958 выявля-

ет положительными образцы на более ранних этапах заболевания, чем ее коммерческие аналоги. Планируется в ближайшее время провести расширенные испытания тест-системы на 27 сероконверсионных панелях.

Разработанная тест-система продемонстрировала высокую специфичность. При испытаниях в условиях предприятия параметр специфичности составил 100% (2519 образцов), в клинических лабораториях — 99,7% (87638 исследований).

Следует отметить высокую стабильность и точность разработанной тест-системы: показатель межсерийных различий (CV) результатов анализа для 13 выпущенных промышленных серий тест-системы составил 5,87%.

Таким образом, полученные результаты исследования показали, что разработанная тест-система повышенной чувствительности для определения антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2 и антигена p24 ВИЧ-1 по диагностическим показателям качества (чувствительность и специфичность) 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.

#### Список литературы

1. WHO. UNAIDS. Global report. Global summary of the AIDS epidemic. www.unaids.org
2. ВИЧ-инфекция. Информационный бюллетень № 36//Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИДом. Москва. — 2012. — Инф. бюл. № 36. www.hivrussia.org
3. ВІА-інфекція в Україні. Інформаційний бюлетень//К., МОЗ. — 2012. — № 38. — 37 с.
4. Практичний посібник з імуноферментного аналізу/Іванська Н. В., Кислик О. М., Максименко О. В. та ін./під ред. Гуралю А. А. та Співака М. Я. — К.: Діапроф-Мед, ДМП „Полімед“, 2003. — 51 с.
5. 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, N2 — P34-49.
6. 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 — P1-22.

