

С. Н. Дробченко¹,
канд. хим. наук

Б. Ривец²,
проф.

Ф. Сэмюэльс³,
проф.

¹ЗАО «Биоград», Санкт-Петербург

²«Orgenics LTD», Израиль

³«Orgenics PBS», Франция

БЕСПРИБОРНЫЕ ТЕСТЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

В статье проанализированы результаты Российских государственных испытаний и испытаний ВОЗ экспресс-тестов на ВИЧ, поставлявшихся в рамках приоритетного национального проекта в сфере здравоохранения в 2007–2009 гг. Все из поставлявшихся тестов, за исключением ИммуноКомб, были иммунохроматографическими. Испытания показывают, что тесты ИммуноКомб дают результаты, близкие к классическим ИФА-тестам на сероконверсионных панелях, а также обладают более высокой прогностической ценностью положительного результата, чем рассмотренные иммунохроматографические тесты.

В 2007–2009 гг. в рамках Приоритетного национального проекта в сфере здравоохранения для экспресс-скрининга на наличие антител к ВИЧ в медицинские учреждения России были поставлены следующие бесприборные тесты для экспресс-определения антител к ВИЧ: Ретрочек ВИЧ, Детермин ВИЧ-1/2, ИммуноКомб ВИЧ 1+2 БиСпот и ИХА-ВИЧ 1,2-фактор. Эти тесты могут выполняться в лабораториях, клиниках, машинах медицинских служб, кабинетах семейного врача.

Цель работы — анализ результатов Российских государственных испытаний и испытаний ВОЗ указанных выше тестов. Исходя из приведенных данных по чувствительности, специфичности тестов и распространенности ВИЧ в России, рассчитана прогностическая ценность положительного результата (*PPV*) теста.

Методы

Тесты Ретрочек ВИЧ, Детермин ВИЧ-1/2, ИХА-ВИЧ 1,2-фактор основаны на принципе иммунохроматографии (ИХА). ИХА-тесты выполнены в виде тест-полоски или тест-кассеты. Принцип действия ИХА-теста состоит в том, что физиологическая жидкость, нанесенная на тест-полоску или тест-кассету, начинает мигрировать вдоль полоски, как это происходит при тонкослойной хроматографии. Подвижной фа-

зой в данном случае является физиологическая жидкость. Анализируемый образец сыворотки (плазмы) или цельной крови всасывается поглощающим участком тест-кассеты. Кроме линии, содержащей антигены к ВИЧ, полоски обычно снабжаются контрольной линией, обеспечивающей регистрацию иммуноглобулинов класса G.

Для проведения анализа на ИХА-тестах вносят 1–2 капли (примерно 25–50 мкл) сыворотки или плазмы в область образца тестовой кассеты, далее добавляют 1 каплю буфера (примерно 40 мкл) и через 10–20 мин считывают результат. Наличие видимых линий в тестовой и контрольной позициях означает положительный результат, появление только контрольной линии свидетельствует об отрицательном образце, отсутствие контрольной линии указывает на недействительность теста. Не допускается считывание результата после 20 мин, так как окраска линий нестабильна. К преимуществам данных тестов относится получение результата в течение 10–20 мин, возможность использования без дополнительного оборудования, хранение при комнатной температуре.

Следует иметь в виду, что иммунохроматографические тест-полоски не лишены недостатков. Это касается надежности, чувствительности и экономичности тестов. Надежность и чувствительность зависят, во-первых, от качества используемых в тесте реагентов и, во-вторых, от концентрации антигена в биоматериале. Качество используемых реагентов зависит от способов их получения, очистки и фиксации на полоске, концентрация антигена — от стадии забора и количества биоматериала.

Тесты ИммуноКомб ВИЧ 1+2 БиСпот выполнены в оригинальном формате ИммуноГребней. Такой формат, с твердой фазой иммуноферментного анализа (ИФА), расположенной на выступах-зубцах полимерного гребня, позволяет переносить твердую фазу между необходимыми растворами реагентов.

Отличительной особенностью тестов ИммуноКомб ВИЧ 1+2 БиСпот является проведение полноценного ИФА без использования оборудования.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Наименование БиСпот означает двухточечный — по наличию двух отдельных точек на антителе к ВИЧ-1 и к ВИЧ-2 на каждом зубце гребня. В тесте предусмотрен также внутренний контроль (третья точка), подтверждающий достоверность проведенного анализа и сохранность реагентов во время транспортировки и хранения. Все необходимые реагенты (разбавитель образца, промывочные растворы, конъюгат) помещены производителем в лунки планшеты — проявочной ванны. В отличие от классического ИФА, где в лунки планшеты, содержащей твердую фазу анализа, последовательно заливают необходимые реагенты, перенос твердой фазы между лунками планшеты, содержащей готовые растворы, значительно проще осуществлять вручную, без использования дорогостоящего оборудования. Это позволило фирме «Орженикс» создать тест, воспроизводящий классический ИФА без использования оборудования за меньшее время (36 мин) и с возможностью проведения индивидуального анализа. Для обеспечения высокой чувствительности тестов ИммуноКомб подобрана реакция связывания с использованием фосфатно-щелочного конъюгата. Французское агентство по контролю за медикаментами (АДА), оценивая тесты, разрешенные для использования в клиниках Европы, подчеркивает, что использование фосфатно-щелочного конъюгата позволяет достичь наиболее высокой чувствительности по сравнению с тестами, основанными на пероксидазной реакции. Результаты анализа проявляются в виде серо-голубых точек на зубцах гребня, при этом окраска появляется на твердой фазе и стабильна после остановки реакции, что позволяет документировать результаты анализа. Формирование окрашенного комплекса антиген-антителе непосредственно на твердой фазе увеличивает чувствительность теста и облегчает промывку от неспецифических взаимодействий.

Для проведения анализа образец (сыворотка или плазма крови) в количестве 50 мкл вносят в ячейки первого ряда проявочной ванны. Анализ проводят переносом гребня из одного ряда проявочной ванны в другой с инкубацией на каждом шаге. Результаты анализа проявляются через 36 мин в виде окрашенных точек на зубце. Появление только верхней точки (внутренний контроль) указывает на то, что исследуемый образец не содержит антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2. Появление на зубце средней точки (вместе с верхней) указывает на присутствие в образце антител к ВИЧ-2. Круглая окрашенная нижняя точка указывает на присутствие в образце антител к ВИЧ-1.

Технология ИммуноКомб была специально разработана для выявления антител на ранних стадиях сероконверсии. При синтезе и нанесении антигенов на твердую фазу (зубцы гребня) были учтены свойства первых антител, которые отличаются от антител, образующихся на более поздних стадиях иммунного отве-

та (различные изотипы синтезированных антител, различная аффинность и авидность, направленность на различные эпитопы антигенов). Тесты ИммуноКомб сочетают достоинства ИФА — высокие чувствительность (100 %) и специфичность (99,7 %) — с достоинствами ИХА — простотой и быстротой постановки анализа, возможностью индивидуального тестирования.

Результаты и обсуждение

Российские государственные испытания [1] показали, что ИФА-тест ИммуноКомб II ВИЧ 1+2 БиСпот выявляет антитела к ВИЧ во всех образцах сероконверсионной панели ВВІ HIV 9017, начиная с 6-го, ИХА-тесты Детермин ВИЧ 1/2, Serodia ВИЧ 1/2, Genie ВИЧ 1/2 — с 10-го образца, ИХА-тест Ретрочек ВИЧ — с 9-го образца, тесты ИХА-ВИЧ 1,2-фактор в испытаниях не участвовали. По данным BioClinical Partners (США) [2] — производителя сероконверсионной панели ВВІ HIV 9017, ИФА тест-системы производства Abbot и Roche выявляют антитела к ВИЧ с 7-го образца данной панели, производства Organon — с 9-го образца.

В соответствии с датой забора образцов [2] данной сероконверсионной панели, ИФА-тест Иммунокомб II ВИЧ 1+2 БиСпот выявляет антитела к ВИЧ на 11–15 дней раньше, чем экспресс-тесты, основанные на принципе ИХА, и на 4–11 дней опережают планшетные ИФА тест-системы известных зарубежных производителей.

Таким образом, применение тестов ИммуноКомб II ВИЧ 1+2 БиСпот для экспресс-скрининга на ВИЧ сокращает период «окна», что особенно важно при обследовании доноров и профилактике вертикальной передачи ВИЧ от матери к ребенку.

Испытания, проведенные ВОЗ [3] на сероконверсионных панелях, показали, что тест ИммуноКомб II ВИЧ 1+2 БиСпот выявляет антитела к ВИЧ-1 на 8,5 дня раньше референс-теста Enzygnost Anti-HIV 1/2 Plus. Тесты Детермин и Ретрочек выявляли антитела позже референс-теста. Данные по испытаниям ВОЗ тест-систем ИХА-ВИЧ 1,2-фактор отсутствуют. По результатам испытаний ВОЗ, чувствительность тестов ИммуноКомб, Детермин, Ретрочек составляет 100 %, специфичность тестов ИммуноКомб II ВИЧ 1+2 БиСпот (99,7 %) превосходит специфичность тестов Детермин ВИЧ (99,4 %) в 2 раза, специфичность тестов Ретрочек ВИЧ (99,1 %) — в 3 раза (количество ложноположительных результатов 0,3; 0,6 и 0,9 %, соответственно).

В таблице приведены значения *PPV* (прогностическая ценность положительного результата), рассчитанные в зависимости от распространенности ВИЧ-инфекции.

Для значений распространенности 0,01 и 6,00 % в таблице приведены значения *PPV*, указанные в отчетах

Значения *PPV* экспресс-тестов при различной распространенности ВИЧ

Распространенность ВИЧ, %	Прогностическая ценность положительного результата (<i>PPV</i>), %		
	ИФА ИммуноКомб II ВИЧ 1+2 БиСпот	ИХА Детермин ВИЧ-1/2	ИХА Ретрочек ВИЧ
0,01 (данные ВОЗ)	3,23	1,64	1,1
0,10	25,02	14,30	10,01
0,30 (средняя по РФ)	50,08	33,40	25,06
1,00	77,10	62,74	53,5
6,00 (данные ВОЗ)	95,51	91,41	87,64

ВОЗ [3]. Для остальных значений распространенности *PPV* рассчитаны по формуле, используемой ВОЗ.

При среднем по России уровне распространенности ВИЧ (0,30 %) прогностическая ценность положительного результата у тестов ИммуноКомб II ВИЧ 1+2 БиСпот составляет 50 %, у тестов Детермин ВИЧ 1/2 — 33 %, у тестов Ретрочек ВИЧ — 25 %. Это означает, что количество подтверждающих тестов, необходимых при работе с тест-системами ИммуноКомб II ВИЧ 1+2 БиСпот, будет в 1,5 раза меньше, чем при работе с тест-системами Детермин ВИЧ 1/2,

и в 2 раза меньше, чем при работе с тестами Ретрочек ВИЧ.

Выводы

Применение тестов ИммуноКомб II ВИЧ 1+2 БиСпот для экспресс-скрининга на ВИЧ сокращает период «окна», минимизирует ложноположительные результаты, которые особенно нежелательны при назначении химиопрофилактики при родах и в период новорожденности.

Литература

1. Отчет о сравнительных испытаниях диагностических тест-систем для выявления антител к ВИЧ, разрешенных к применению в РФ, МЗРФ 22.03.04, табл. 24.
2. BioClinical Partners Inc., Franklin, MA, 02038, USA Seroconversion Panel Catalog no. HIV 9017.

3. World Health Organization. HIV Assays: Operational Characteristics Report 16/Simple/Rapid tests. Geneva: WHO, 2009. Annex 2, P. 38.