

Возможности современных методов иммуноферментной диагностики ВИЧ-инфекции

**Голубева И.Ф.
ООО «НПО «Диагностические системы»**

Казань, 2014г

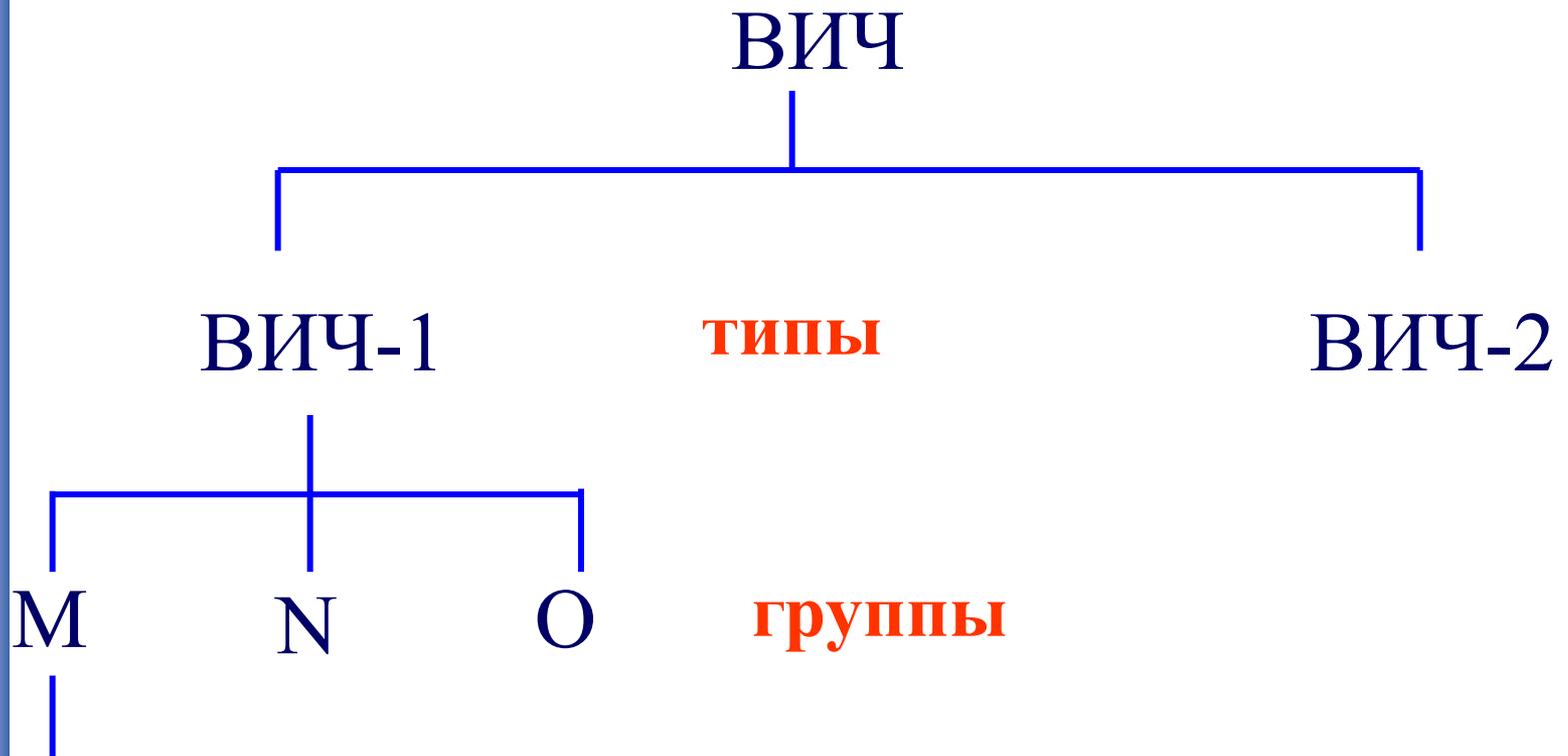


Современные тенденции распространения ВИЧ-инфекции в России

- Основной регистрируемый путь передачи - внутривенное введение **наркотиков**
- Инфицируются подростки и молодые люди 16-29 лет - **репродуктивный возраст**
- Быстрый рост числа инфицированных **женщин** - **беременность** - инфицированные **дети**
- Гетеросексуальное распространение - вовлечение **социально-активной** части общества
- Социальная **изолированность** людей с ВИЧ



Классификация ВИЧ



А1, А2, В, С, D,
F1, F2, G, H, J, K

Субтипы

типы: ВИЧ-1 и ВИЧ-2
50% гомологии

группы: ВИЧ-1 группы М, N и O
60-70% гомологии

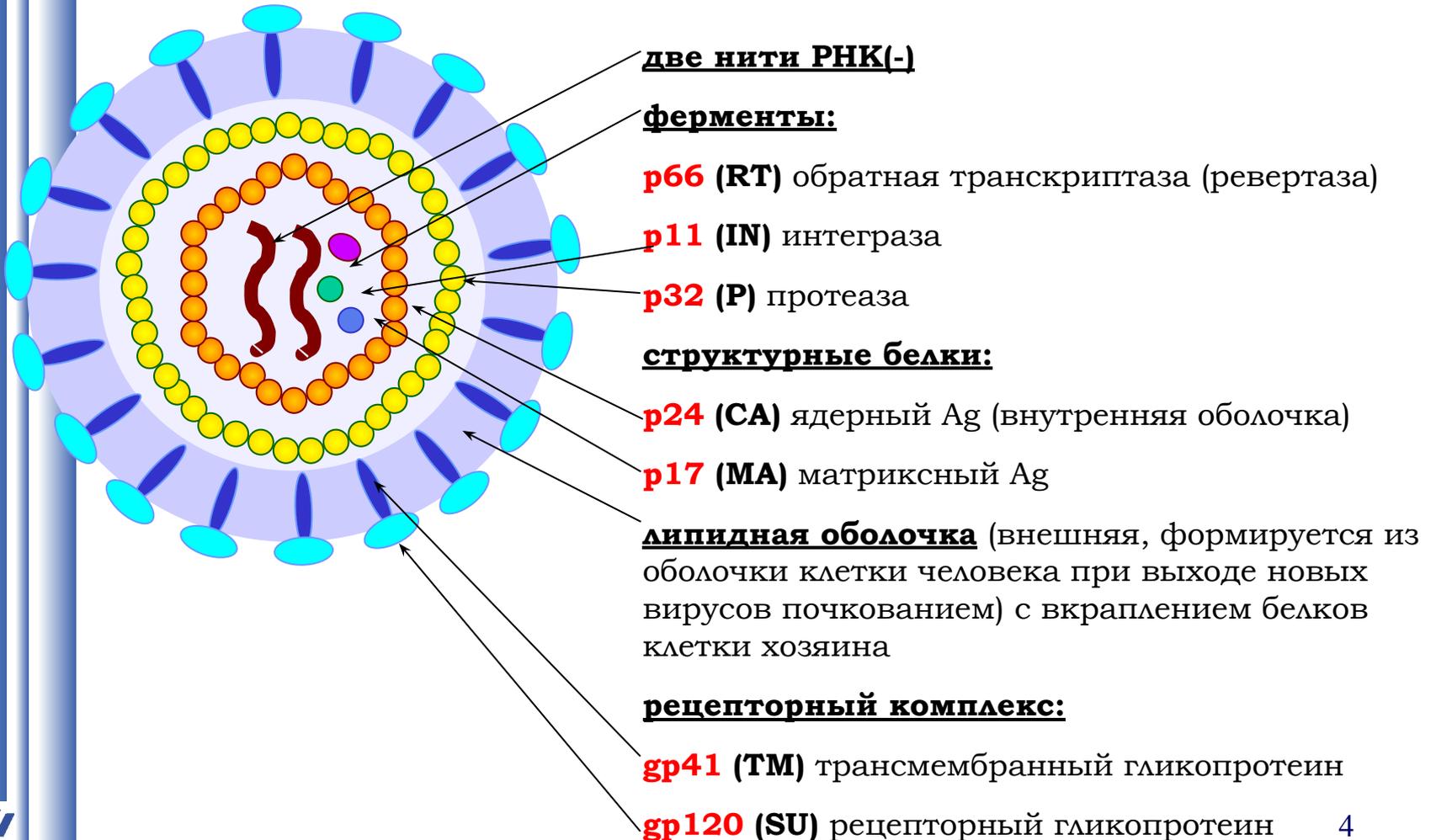
субтипы: ВИЧ-1 субтипы А-J
>70% гомологии



Строение ВИЧ

антитела

спектр антител к разным белкам ВИЧ



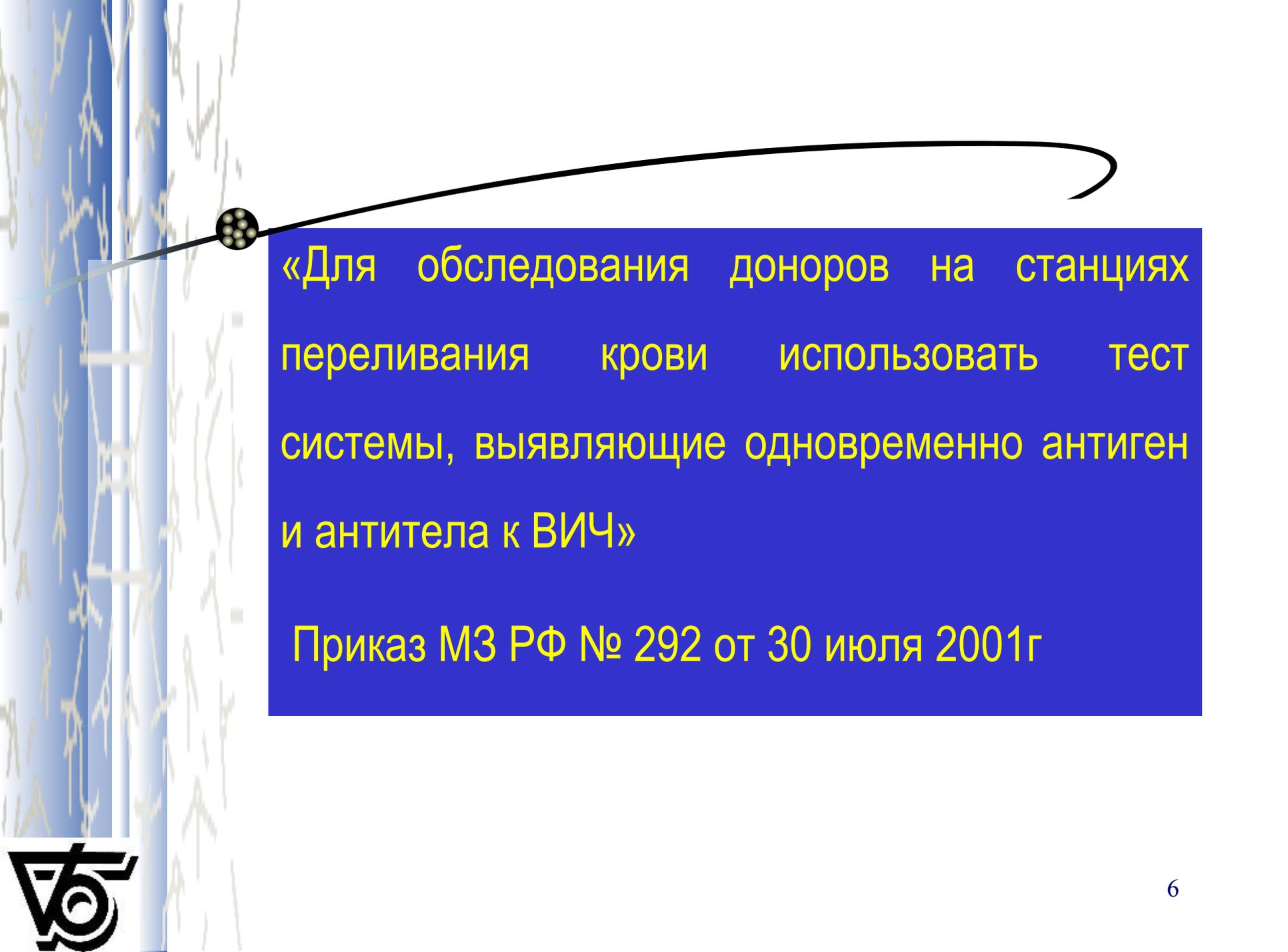
В настоящее время лабораторная диагностика ВИЧ-инфекции основывается на определении **антител к белкам вируса иммунодефицита 1-го и 2-го типа,**
а также вирусного антигена p24 в образцах крови, плазмы или сыворотки.

В качестве дополнительных подтверждающих тестов используют:

- ✦ Western blot (WB)
- ✦ иммунофлюоресцентный анализ
- ✦ реакцию иммунопреципитации

В России тесты на основе WB, на сегодняшний день, являются единственным подтверждающим форматом.



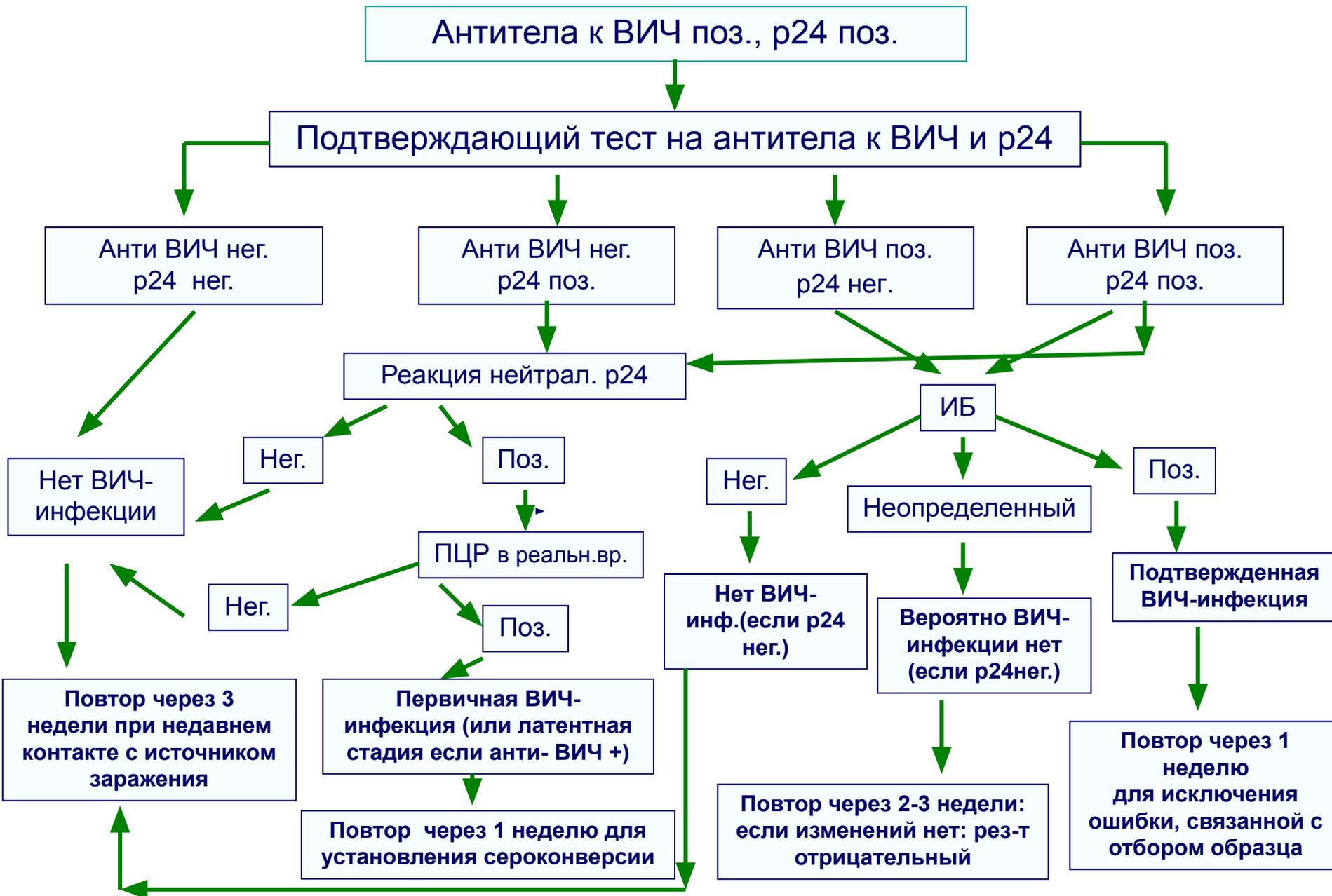


«Для обследования доноров на станциях переливания крови использовать тест системы, выявляющие одновременно антиген и антитела к ВИЧ»

Приказ МЗ РФ № 292 от 30 июля 2001г



Алгоритм подтверждения результатов тестов четвертого поколения (B.Weber. 2006)



Выявление антигена р 24 ВИЧ-1 может быть ценным в следующих ситуациях:

- Выявление ВИЧ инфекции на ранних стадиях (в период серологического окна, когда в крови еще невозможно определить антитела)
- Скрининг крови
- Мониторинг противовирусной терапии
- вспомогательный тест в разрешении вопроса о неопределенных результатах, полученных с помощью иммуноблота
- вспомогательный тест для диагностики ВИЧ инфекции у новорожденных



Тест-системы ИФА для диагностики ВИЧ-инфекции :

«ДС-ИФА-анти-ВИЧ-Униф»

Тест-система иммуноферментная для выявления антител к вирусам иммунодефицита человека 1 и 2 типов.

«ДС-ИФА-ВИЧ-АГ+АТ»

выявление антител к вирусу иммунодефицита человека 1 и 2 типов, и антигена ВИЧ-1 (p24)

«МилаЛаб-ИФА-ВИЧ-АГ+АТ»

выявление АТ к ВИЧ 1 и 2 типов и АГ ВИЧ-1 (p24) в сыворотке (плазме) крови человека.

Рекомендуется для первичной лабораторной диагностики ВИЧ инфекции и обследования доноров крови. Чувствительность по p24 ВИЧ-1 ≤ 20 пг/мл.

«МилаЛаб-ИФА-ВИЧ-АГАТ»

выявление АТ к ВИЧ 1 и 2 типов и АГ ВИЧ-1 (p24) в сыворотке (плазме) крови человека.

Рекомендуется для первичной лабораторной диагностики ВИЧ инфекции и обследования доноров крови. Чувствительность по p24 ВИЧ-1 ≤ 20 пг/мл.

ДС-ИФА-ВИЧ-АГ-СКРИН

Для определения антигена p24 ВИЧ-1 с чувствительностью 0,5 пг/мл

ДС-ИФА-ВИЧ-АГАТ-СКРИН

Для одновременного выявления антител к ВИЧ 1,2 и антигена p24 ВИЧ-1 с чувствительностью 10 пг/мл

ДС-ИФА-ВИЧ-АТ/АГ-СПЕКТР

Для выявления суммарных антител к отдельным белкам ВИЧ-1,2 и антигена p24 ВИЧ-1



Расширенные позиции реагентов:

Стандарт ВИЧ-1 АТ (+)

комплект №1 (для входного контроля т/с ДС и др. отечественных производителей с высокой чувствительностью по р24)

комплект №2 (для входного контроля т/с чувствительностью по р24 более низкой (20пкг/мл) и входного контроля иммуноблота.

Стандарт ВИЧ-2 АТ (+)

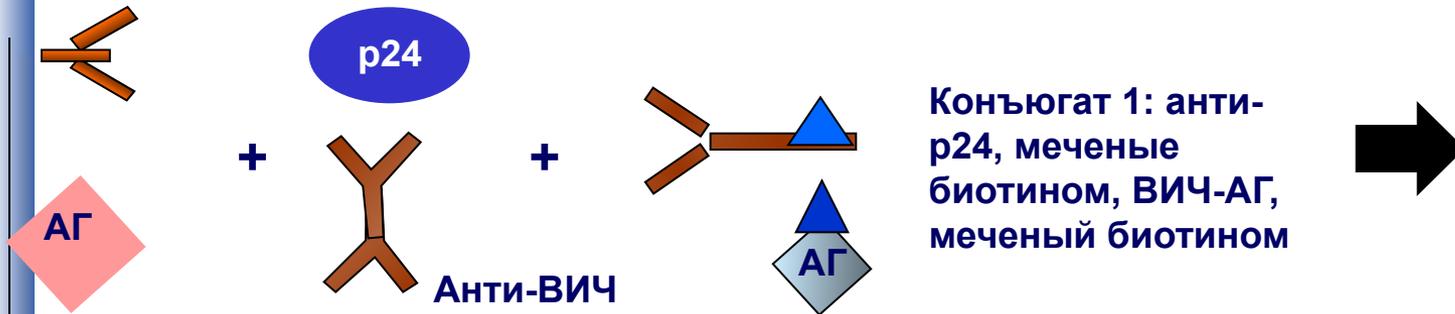
комплект №1

комплект №2

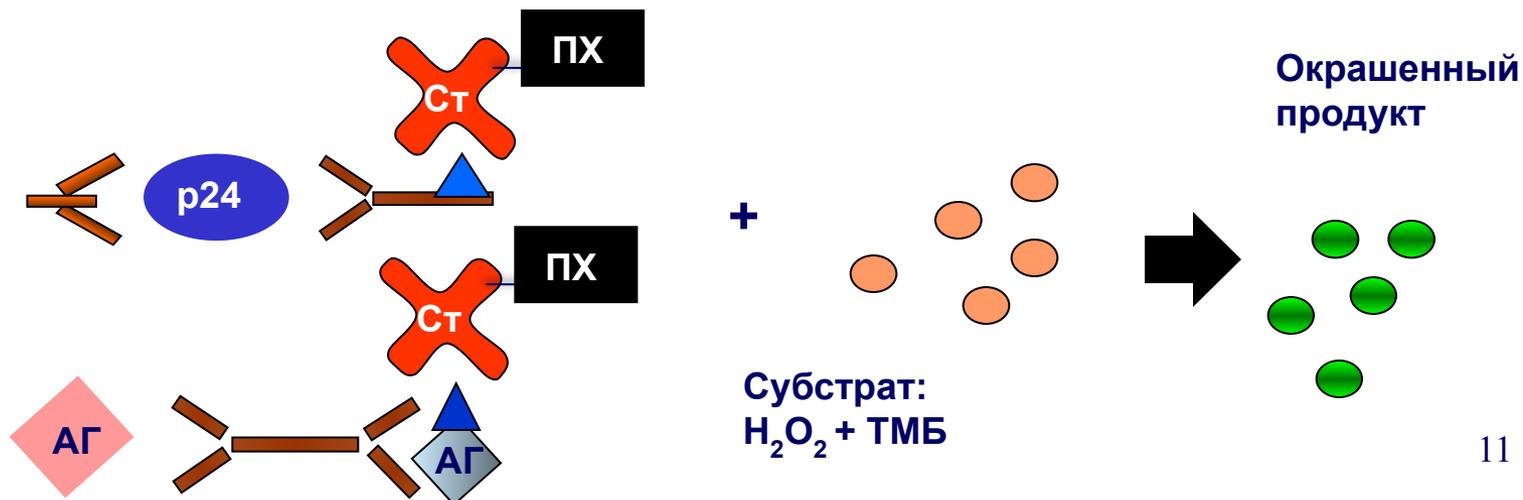
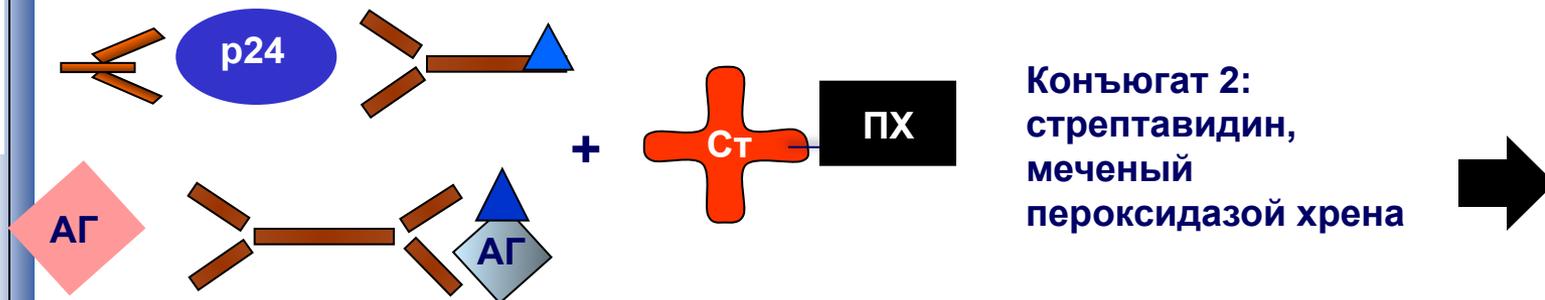
Стандарты на ВИЧ (дополнительные комплекты) имеют отдельные каталожные номера, соответственно, при заказе они идут отдельными позициями.



Схема иммуноферментной тест-системы «ДС-ИФА-ВИЧ-АГАТ-СКРИН»



Иммоб.
Анти-p24
и
ВИЧ-АГ



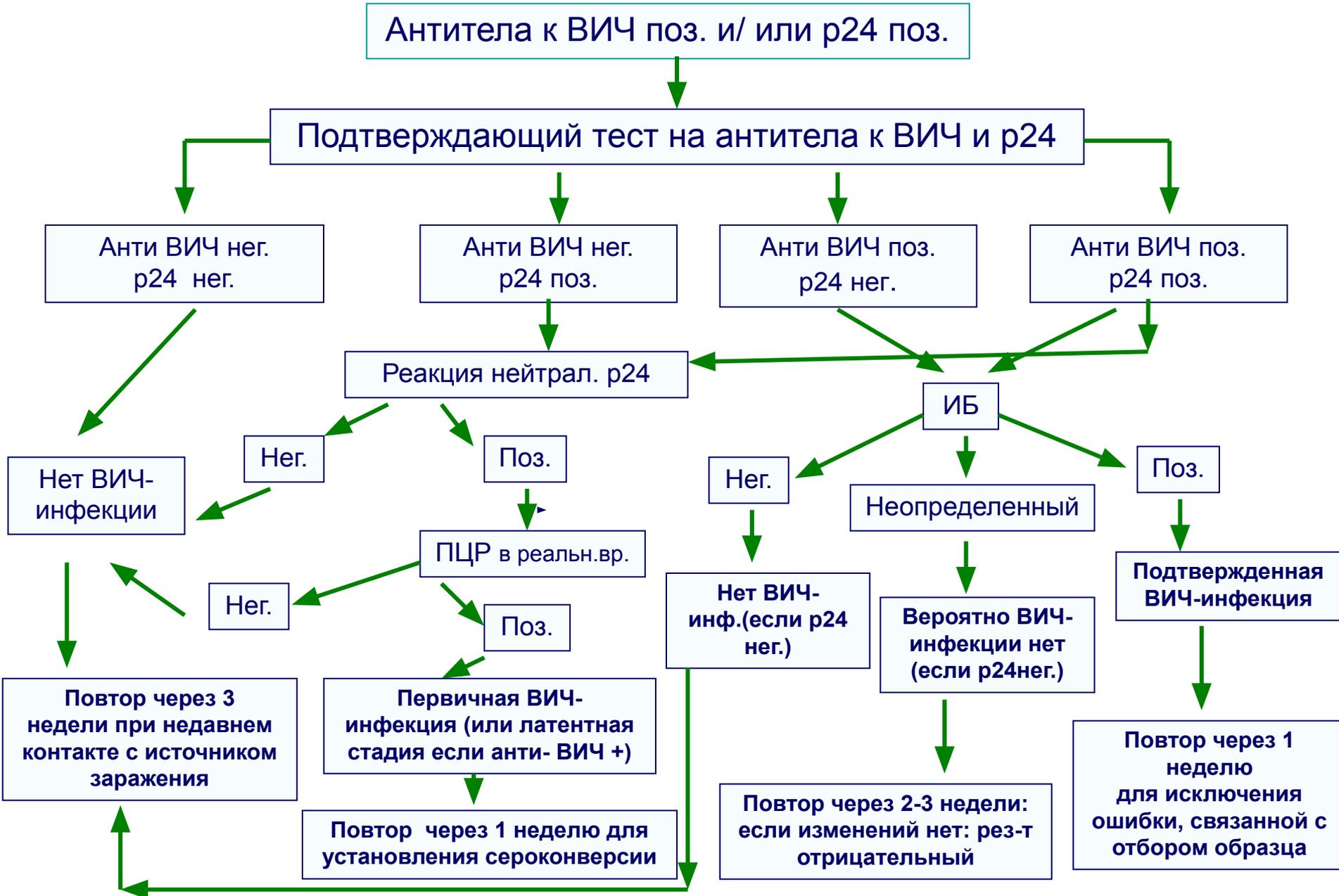
ДС-ИФА-ВИЧ-АГ/АТ- СКРИН

Преимущества:

1. Чувствительность по антигену p24 – 10пг/мл
2. В иммуносорбент введен антиген ВИЧ-1 p31, расширен эпитопный состав антигена gp 41.
3. Объем образца для анализа - 70 мкл
4. Время анализа 1 ч 25 мин (шейкер), 1ч 50 мин (термостат)
5. Срок хранения – 12 мес.
6. Одностадийный вариант
7. Визуальная оценка внесения образцов и компонентов реакции
8. Специфичность – 99,2%



Алгоритм подтверждения результатов тестов четвертого поколения (B.Weber. 2006)



Тестирование образцов сыворотки крови в «New Lav Blot I» и «ДС-ИФА-ВИЧ-АТ/АГ- СПЕКТР»

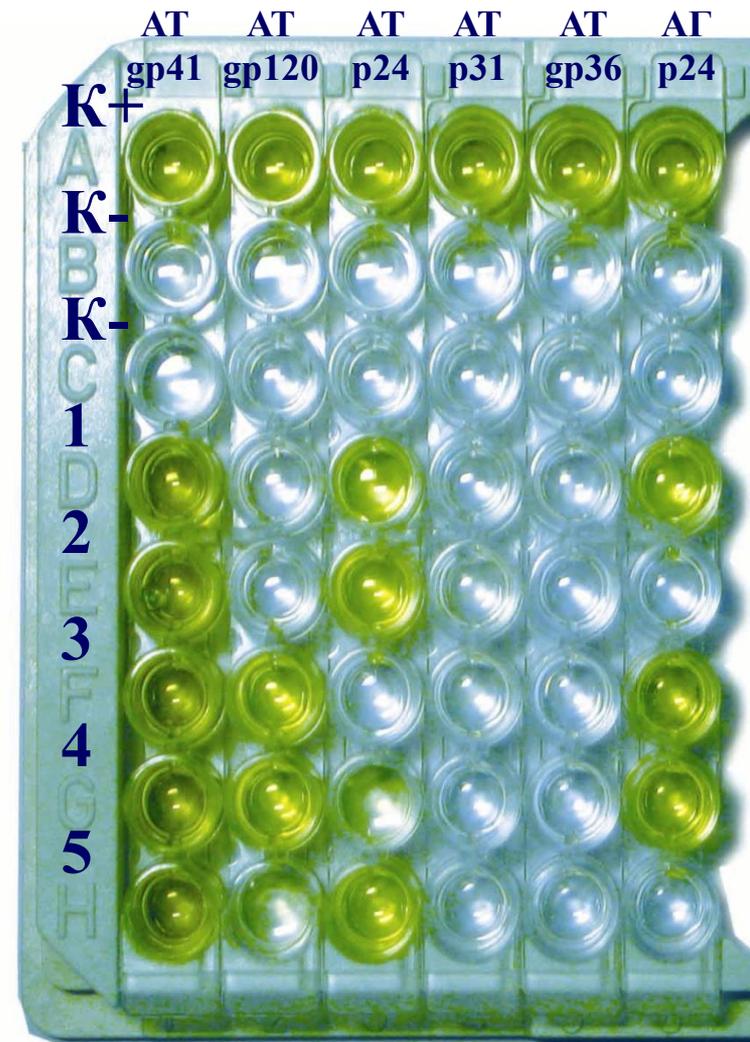
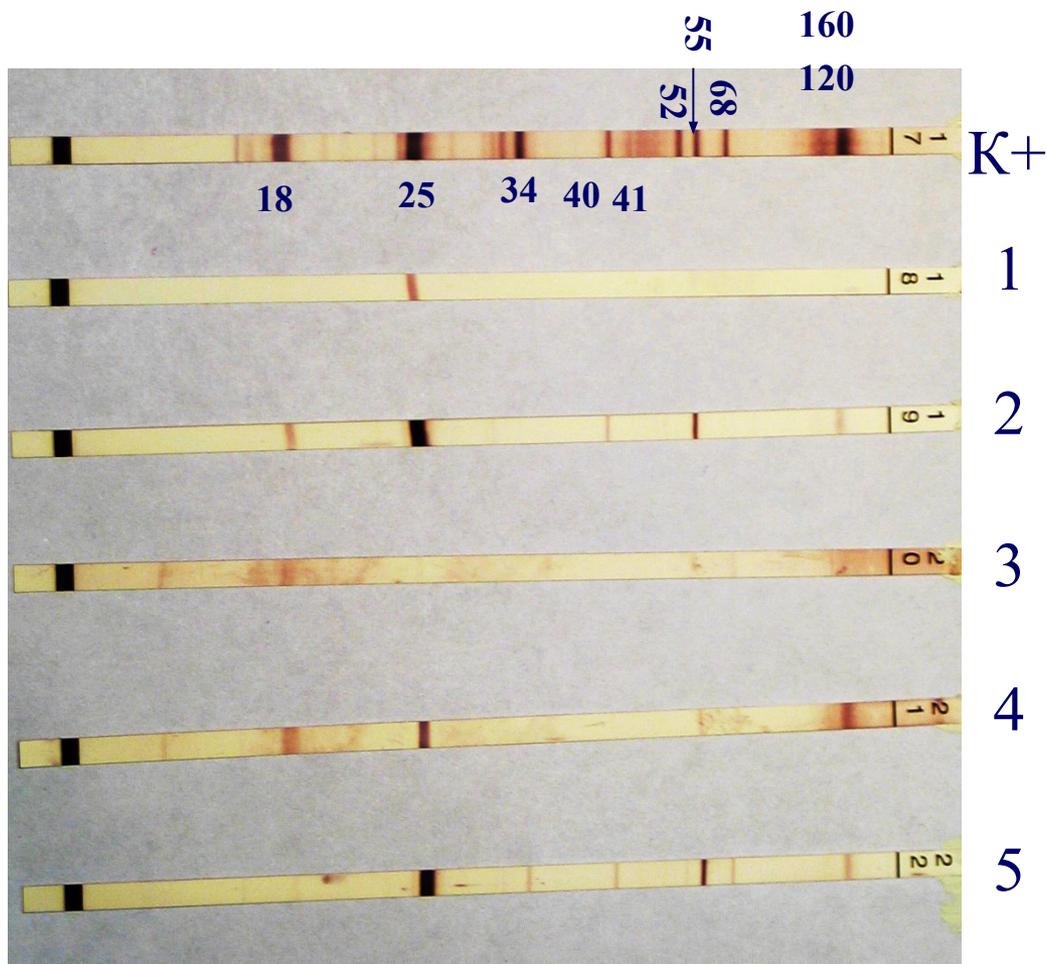


Схема постановки «ДС-ИФА-ВИЧ-АТ/АГ- СПЕКТР

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	gp41	gp120	p24	p31	gp 36	анти-р 24	gp41	gp120	p24	p31	gp 36	анти-р 24
A	K+	K+	K+	K+	K+	K+	6	6	6	6	6	6
B	K-	K-	K-	K-	K-	K-	7	7	7	7	7	7
C	K-	K-	K-	K-	K-	K-	8	8	8	8	8	8
D	1	1	1	1	1	1	9	9	9	9	9	9
E	2	2	2	2	2	2	10	10	10	10	10	10
F	3	3	3	3	3	3	11	11	11	11	11	11
G	4	4	4	4	4	4	12	12	12	12	12	12
H	5	5	5	5	5	5	13	13	13	13	13	13



Рекомендуемые критерии для интерпретации результатов «ДС-ИФА-ВИЧ-АТ/АГ-СПЕКТР»

АТ gp41	АТ gp120	АТ p24	АТ p31	АГ p24	АТ gp36	Результат
+	+ 1 любой				-	положительный по ВИЧ 1
-	-	-	-	+	-	положительный по ВИЧ 1
-	-	+ (-)	+ (-)	-	+	положительный по ВИЧ 2
+	+	+	+	+ (-)	+	положительный по ВИЧ 1 или ВИЧ 1 и ВИЧ 2
другие профили						неопределенный
-	-	-	-	-	-	отрицательный

Преимущества

- Выявление АТ к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 с помощью одного набора реагентов
- Высокая специфичность (пока 100%)
- Три комплектации: 18, 24 и 36 определений;
- Два варианта инкубации;
- Все реагенты готовы к использованию
- Большой спектр белков ВИЧ



ДС-ИФА-ВИЧ-АТ-СРОК

тест для определения
вероятного срока заражения
ВИЧ 1



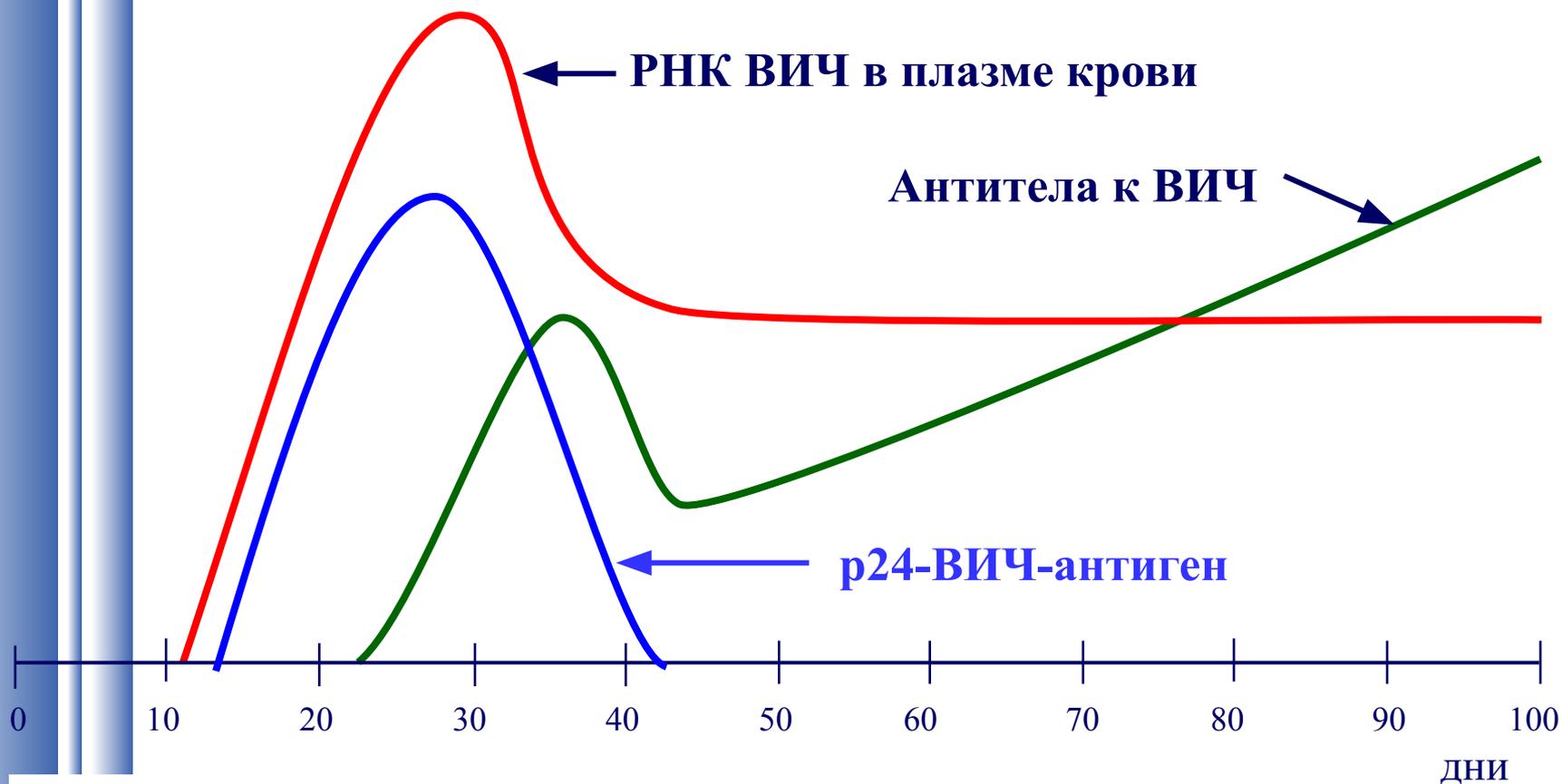
Диагностика ранней стадии ВИЧ-инфекции:

1. Выявление контакты ВИЧ-инфицированного с потребителями инъекционных наркотиков и половыми партнерами.
2. Выявление групп населения с высокой заболеваемостью дает возможность проводить целенаправленные профилактические вмешательства.
3. Эпидемиологические расследования.

Не применяется для скрининговых исследований!



Маркеры ранней стадии ВИЧ-инфекции



РНК ВИЧ в плазме крови
p24-ВИЧ-антиген (0,5 пг/мл)
Антитела к ВИЧ

11 день
13 день
22 день

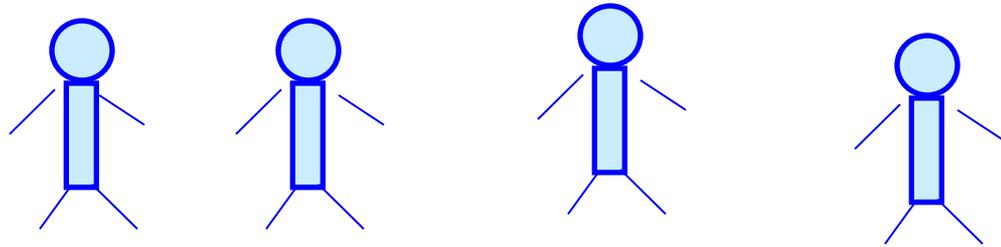
2 дня
9 дней

Применение «ДС-ИФА-ВИЧ-АТ-срок» при эпидемиологических расследованиях

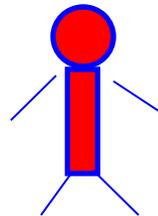
Выявлена группа ВИЧ-инфицированных лиц



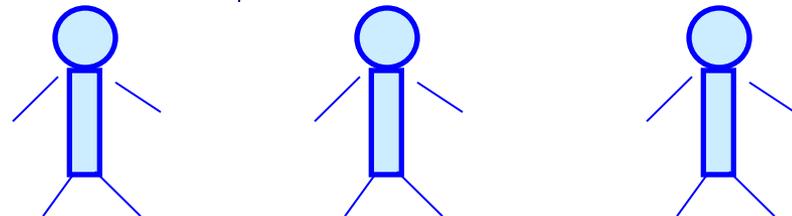
Кто является источником?



Всем лицам делается тест на давность заражения



Поздняя стадия заражения

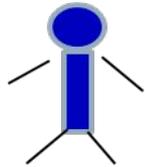


Ранняя стадия заражения



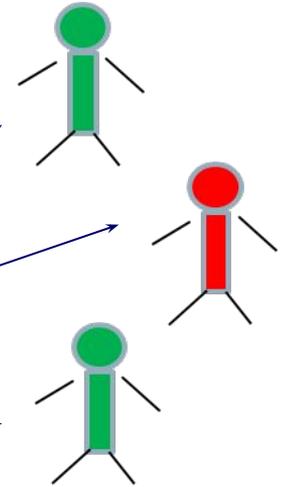
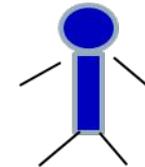
Расследование случаев и очагов ВИЧ-инфекции

ВИЧ-инфекция
пациента с
половой жизнью



выявлена у
беспорядочной

Определение
давности
заражения



От кого он
заразился?

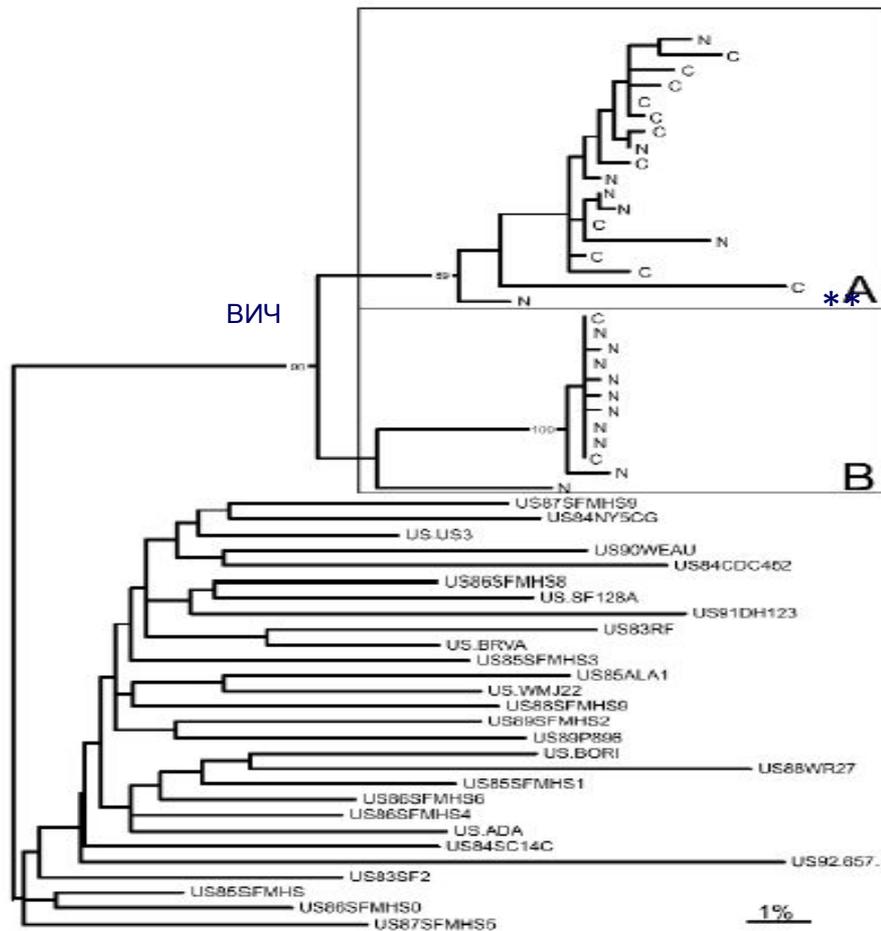
Инфицирован
менее 9 месяцев

Обследуем всех, с кем
он контактировал на
протяжении последних
9 месяцев



Помощь при филогенетическом анализе

Но! По филогенетическому анализу невозможно установить, кто является источником вируса, а кто заразившимся. Можно только утверждать, что вирусы практически идентичны.



Люди, кластеризовавшиеся с пациентом А, имеют между собой практически идентичный вирус

Тест на давность заражения

Если будет установлено, что пациент А находится на поздней стадии заражения, а остальные люди на ранней, то будет известно, **кто является источником заражения.**

** - The use of phylogenetic analysis as evidence in criminal investigation of HIV transmission - Edwin J Bernard, Yusef Azad, et al. Feb. 2007



Интерпретация результатов тестирования:

Вероятный срок инфицирования оценивается сравнением ОП неразведенного исследуемого образца (нативного) и разведенного. % падения ОП при разведении образца рассчитывается по формуле:

$$100\% - \frac{(\text{ОП развед. образца} - \text{ОП ср. РРС})}{\text{ОП цельного образца}} \times 100\%$$

где ОП ср. РРС – среднее значение ОП Раствора для разведения сывороток.

Если падение **ОП > 40%** – вероятный срок инфицирования до 9 месяцев (**ранняя ВИЧ - 1 инфекция**).

Если падение **ОП ≤ 40%** – вероятный срок инфицирования 9 и более месяцев (**длительно текущая ВИЧ-1 инфекция (поздняя)**).

Для учета и обработки результатов рекомендуется использовать программу Excel.



Тесты для определения ранней ВИЧ-инфекции (не зарегистрированы в РФ)

Тест	Производитель
BED-CEIA	Sedia Biosciences Corporation Calypse Biomedical Corporation www.calypse.com
Avioq HIV-1 microelisa system	Avioq www.avioq.com
OraQuick Advance Rapid HIV-1/2 assay	OraSure www.orasure.com
AxSYM HIV- ½ gO (модифицированный коммерческий)	Abbott www.abbottdiagnostics.com
INNO-LIA™ HIV I/II Score (модифицированный коммерческий)	Innogenetics www.innogenetics.be



Области применения теста

- Эпидемиологическое расследование случаев и очагов ВИЧ-инфекции.
- Дополнение к филогенетическому анализу.
- Эпидемиологический надзор за динамикой выявления сероконверторов в различных контингентах (поло-возрастные, социальные группы населения).
- Дополнительное исследование при мониторинге распространения лекарственной устойчивости.



Тест-система «ДС-ИФА-ВИЧ-АТ-СРОК»:



Единственная в Российской Федерации тест-система, позволяющая определить вероятный период инфицирования ВИЧ-1.

Чувствительность теста «ДС-ИФА-ВИЧ-АТ-СРОК» сравнима с чувствительностью тестов 3-его поколения для выявления антител к ВИЧ-1/2.

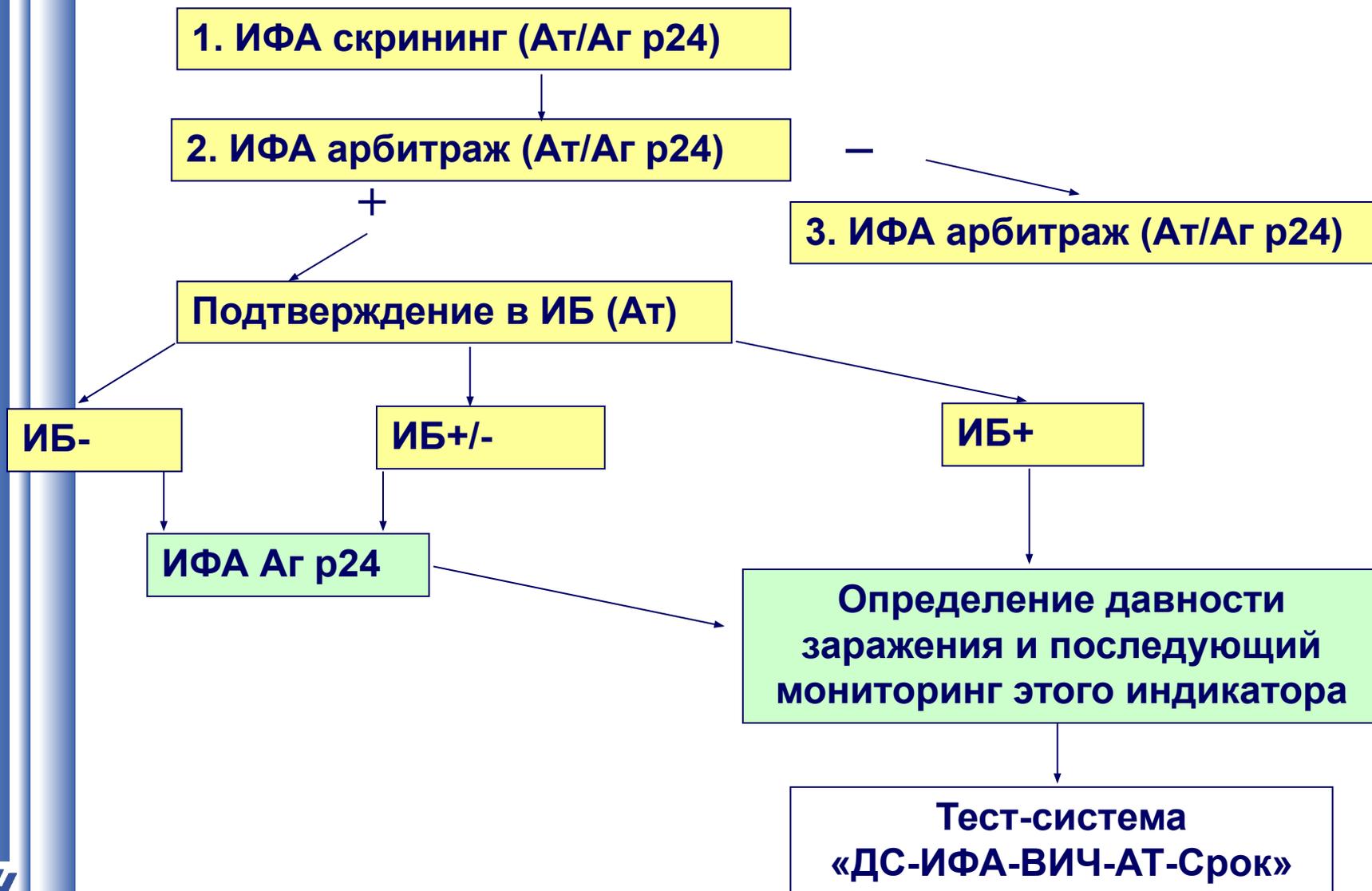
Имеется возможность исследования образцов сывороток, содержащих антитела к ВИЧ-1 различных субтипов.

Имеется возможность исследования образцов сывороток, содержащих антитела к ВИЧ-1 группы O.

Тест-система проста и удобна в работе.



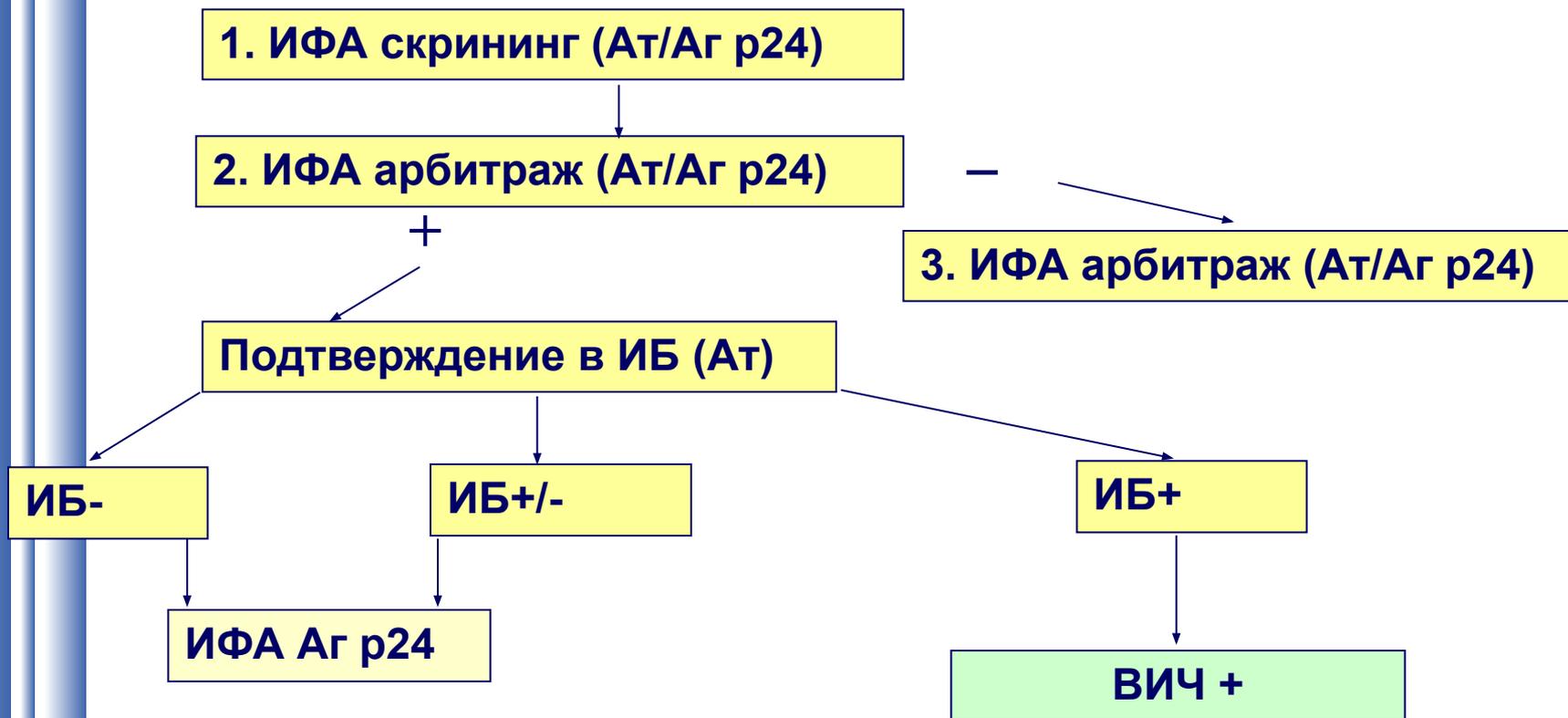
Алгоритм с определением давности заражения



«ДС-ЛИА-ВИЧ-1,2»



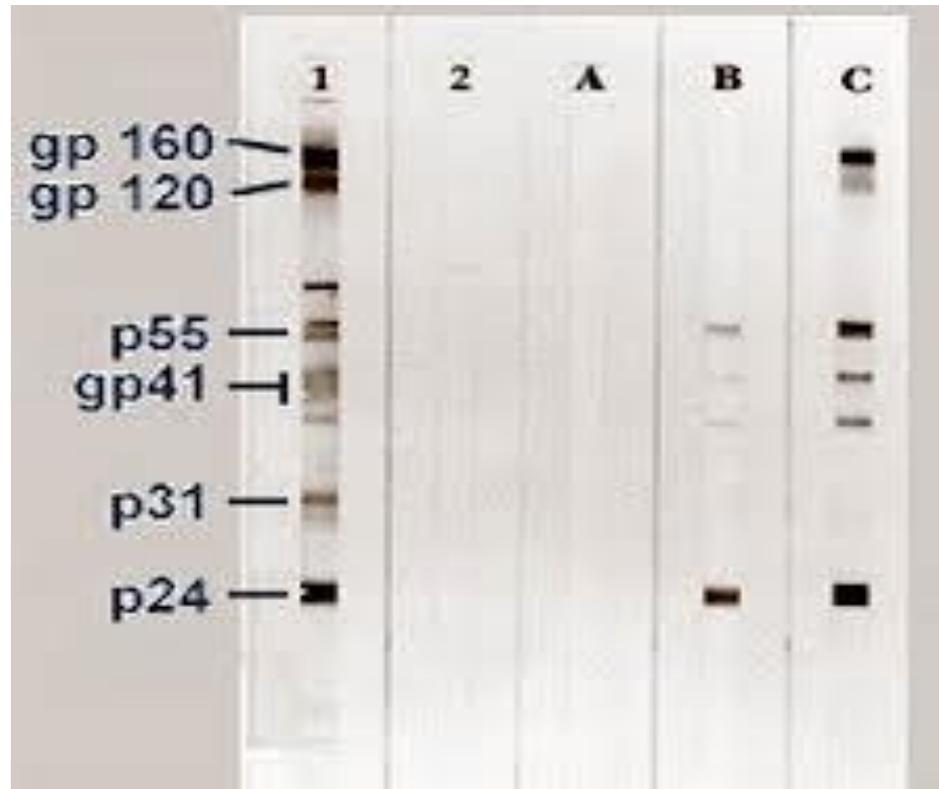
Алгоритм диагностики ВИЧ-инфекции



Иммунный блоттинг (иммуноблот, Western Blot, вестерн-блот) сочетает в себе иммуноферментный анализ (ИФА) с предварительным электрофоретическим переносом на нитроцеллюлозную полоску (стрип) антигенов вируса.

«**blot**» - «клякса»

«**western**» - «западный» отражает направление распространения этой «кляксы» по бумаге слева направо, то есть на географической карте это соответствует направлению с запада на восток.»



На каждом тест-стрипе расположены:

ВИЧ-1:

- gp 160 – env1
- gp 120 – env1
- gp 41 – env1
- p51/66 - pol
- p 31 - pol
- p 24 - gag
- p 17 – gag

ВИЧ-1 группа O

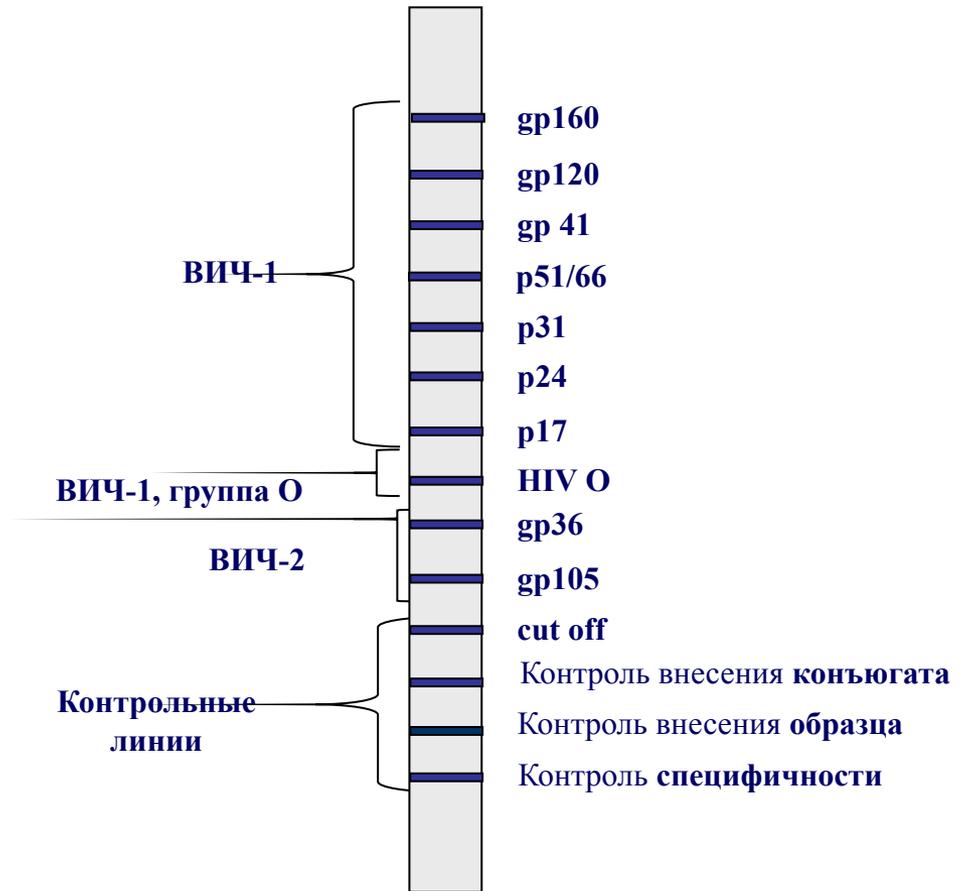
- HIV O – env1

ВИЧ-2:

- gp 36 – env2
- gp 105 – env2

Контрольные линии:

- 1 – cut off (IgG человека);
- 2 – контроль внесения конъюгата (IgG человека);
- 3 – контроль внесения образца (антитела к IgG человека)
- 4 – контрольный антиген, не содержащий детерминант ВИЧ – для определения специфичности реакции.



Положительный

2 env одного типа (ВИЧ-1 (gp160/gp41/env HIV 1 гр.О и **gp120**) или ВИЧ-2 (gp36 и gp105)) ± gag ± pol
1 env + (gag или pol)
2 env разных типов

Тест на определение антител к ВИЧ: Интерпретация

Твой ВИЧ статус зависит от того, где ты живешь.

3 слабые полосы или одна яркая

11 интерпретаций того, что определяется как ВИЧ+

В Африке больше шансов для анализа быть определенным как ВИЧ+

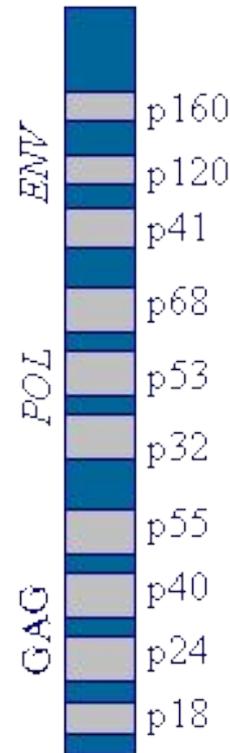
В Австралии меньше всего шансов

6 разных интерпретаций в США

Человек может переехать в другую страну и перестать быть ВИЧ +

Вы знаете другое инфекционное заболевание анализ на которое интерпретируется схожим образом?

HIV
WESTERN
BLOT STRIP



AFR	AUS	FDA	RCX	CDC 1	CDC 2	CON	GER	UK	FRA	MAC
ANY 2	ANY 1	ANY 1	ANY 1	p160/ p120 AND p41	p160/ p120 OR p41	p160/ p120 OR p41	ANY 1	ANY 1	ALL 3	ANY STRONG BAND
	ANY 3 GAG OR POL	p32 AND p24	ANY 1 AND ANY 1		AND p24	p32 OR p24	ANY 1 GAG OR POL	p32 AND p24	ANY 1 OR ANY 1	3 WEAK BANDS OR ANY STRONG BAND

AFR = Африка; AUS = Австралия; FDA = US Food and Drug Administration; RCX = США Красный Крест; CDC = US Center for Disease Control; CON = US Consortium for Retrovirus Serology Standardization; GER = Германия; UK = Англия; FRA = Франция; MACS = US Multicenter AIDS Cohort Study 1983-1992

Преимущества

- Выявление АТ к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 с помощью одного набора реагентов
- Три комплектации: 18, 24 и 36 определений;
- Два варианта инкубации;
- Все реагенты готовы к использованию
- Большой спектр белков ВИЧ





Спасибо за внимание!

www.npods.ru

