

## **ИММУНОЧИП ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОГО ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАПСИДНОГО АНТИГЕНА P24 ВИЧ И АНТИТЕЛ К ВИЧ 1 И 2 ТИПОВ**

**Чеканова Т.А., Маркелов М.Л., Манзенюк И.Н., Шипулин Г.А.**

*ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия.*

### **Введение**

В настоящее время лабораторная диагностика ВИЧ-инфекции располагает большим арсеналом коммерческих скрининговых иммуноферментных тест-систем 3 поколения, выявляющих суммарные антитела к ВИЧ, и тест-систем 4 поколения для одновременного выявления анти-ВИЧ и капсидного антигена p24 в сыворотке/плазме крови человека. Тест-системы для выявления и подтверждения антигена p24, используемые в некоторых странах уже на этапе скрининга, в России не нашли широкого применения. Следует отметить, что требования к диагностикумам трансфузионных инфекций, особенно на маркеры ВИЧ-инфекции, постоянно растут. По данным литературы, диагностическая ценность скрининга крови и кровепродуктов, основанном на параллельном тестировании тест-системами 3 поколения и диагностикумами для выявления p24 ВИЧ в «сэндвич»-ИФА, несколько выше по сравнению с результатами скрининга донорской крови с использованием только тест-систем 4 поколения. Это может быть объяснено, прежде всего, более высокой чувствительностью в отношении выявления антигена p24 специальными монотестами по сравнению с комбинированными диагностикумами 4 поколения. Кроме того, на ранней стадии инфицирования ВИЧ по мере увеличения вирусной нагрузки с параллельным накоплением p24 в сыворотке крови наблюдается скорый ответ иммунной системы в виде продукции специфических антител, что приводит к формированию комплекса «антиген p24 – анти-p24». Комплекс «антиген – антитело» является причиной отсроченного «серологического окна» для тест-систем 4 поколения из-за отсутствия, как правило, в составе иммуносорбента антигена p24 и, как следствие, неспособности детектировать анти-p24. Подтверждающие тест-системы для окончательной постановки диагноза ВИЧ-инфекции, работающие в формате Вестерн-блота или линейного иммунного блоттинга, имеют меньшую чувствительность по сравнению с тестами 3 и 4 поколения. К недостаткам верификационных тестов можно отнести следующие характеристики: выявление спектра антител только класса G, не предусматривается детекция антигена p24, получение неопределенного результата в блоте приводит к дополнительному исследованию.

дованию на наличие антител в динамике, что удлиняет общее время тестирования. Эти факты приводят к необходимости внедрения на стадии подтверждения положительных результатов ИФА более чувствительных тестов. Таким образом, совершенствование скрининговых и подтверждающих тест-систем, наряду с уточнением алгоритма тестирования на маркеры ВИЧ-инфекции, является по-прежнему актуальной задачей.

Новые технологии и прогресс в развитии протеомики, наблюдаемый в последние годы во всем мире, приводит к расширению возможностей диагностики различных заболеваний. Одним из перспективных инструментов в этом направлении может стать диагностика с применением биочиповой технологии, позволяющей в короткий срок, регистрировать отдельно с высокой степенью чувствительности и специфичности наличие целого спектра интересующих маркеров.

**Цель работы:** конструирование и апробация иммуночипа для отдельного определения антител к ВИЧ 1 (включая субтип O) и ВИЧ 2 типов и антигена p24 ВИЧ.

#### **Материалы и методы**

При конструировании иммуносорбента с помощью робота для контактной микропечати «Xactll» (Labnext, США) на поверхность активированных слайдов с альдегидным покрытием (CSS-100 Silylated Slides или VALS 25 Vantage производства CEL Associates Inc., США) в пределах каждого эррея, предназначенного для постановки одного исследуемого или контрольного образца, были отдельно иммобилизованы в виде индивидуальных спотов в подобранных рабочих разведениях очищенная фракция антител сыворотки крови человека субкласса IgG<sub>a</sub>, высокоспецифичная к p24 антигену ВИЧ, а также рекомбинантные антигены, содержащие основные иммунодоминантные фрагменты ВИЧ: gp 160 (env), gp 120 (env), gp 41 (env), p24 (gag), p31 (pol) ВИЧ-1, env ВИЧ-1 субтипа O, gp 36 (env) ВИЧ-2. Кроме того, каждый эррей дополнительно содержал внутренние контроли: отрицательный контроль (сорбционный буферный раствор) и иммуноглобулин человека для исключения ошибок при постановке анализа и контроля качества работы тест-системы. На одном слайде размещали по 12 или 16 зон (эрреев), соответствующих количеству анализируемых образцов.

Рабочая схема постановки анализа на иммуночипе включала очередные инкубации на термошейкере (режим: 37°C с вращением платформы 500 об/мин) исследуемых сывороток крови и контрольных образцов в конечном разведении 1:2 в течение 60 мин, а также 30-минутные экспозиции смеси конъюгатов козьих антител к IgG и IgM человека, меченых биотином, и стрептавидина, модифициро-

ванного TRITC или FITC. Однократная промывка слайдов рабочим раствором ФСБ-Т осуществлялась после каждой стадии инкубаций. Таким образом, для детекции специфических антител к ВИЧ нами был использован метод непрямого анализа в формате иммуночипа с помощью антивидовых конъюгатов. Определение антигена p24 основывалось на принципе конкурентного связывания конъюгатом анти-IgG+IgM человека за свободные Fab-фрагменты человеческих антител к p24 на иммуносорбенте в присутствии антигена в образце.

Уровень специфических антител к каждому из антигенов ВИЧ или антител к p24 оценивали по интенсивности флуоресценции соответствующих спотов относительно фона с помощью сканера «ScanArray Express» («Perkin Elmer», США) с прилагаемым программным обеспечением. Рассчитывали коэффициенты К как модульное отношение абсолютного значения флуоресценции спота (за вычетом фона) к фону. Определяли линию среза (cut off) для каждого иммобилизованного антигена и антител к p24 относительно контрольного отрицательного образца таким образом, чтобы средние значения К спотов с иммобилизованным IgG человека нормировались (сводились к единому) соответственно таковым в эррее с внесенным отрицательным образцом. Полученные поправочные коэффициенты для всех значений К спотов на каждом эррее были автоматически учтены программой.

Для установления критического порога для каждого из антигенов (определение антител) средние значения К контрольного отрицательного образца умножали на два. При получении К выше критического уровня результат на наличие антител к определенному антигену ВИЧ в образце регистрировали как положительный. В тоже время, о наличии антигена p24 в сыворотке/плазме крови человека свидетельствовало снижение средних значений К спотов с иммобилизованными анти-p24 относительно таковых в отрицательном контроле в два и более раз.

Для оценки чувствительности разработанной тест-системы исследовали 300 образцов сывороток крови ВИЧ-инфицированных лиц, поступивших из Клинической инфекционной больницы № 2 г.Москвы; 16 образцов сывороток стандартной панели ГИСК им.Л.А.Тарасевича (ОСО 42-28-212-02П, серия 14), содержащих антитела к ВИЧ-1 в низких концентрациях; 8 сывороток крови стандартной панели ГИСК им.Л.А.Тарасевича (ОСО 42-28-216-02, серия 5), содержащих антитела к ВИЧ 2 типа.

Оценку чувствительности тест-системы в отношении выявления антигена p24 ВИЧ проводили с использованием стандартной панели сывороток крови человека, содержащих антиген ВИЧ-1 p24 в различных концентрациях (ОСО 42-28-375-05, серия 5) и методом

титрования стандарта «Antigen HIV-1 Standard» производства фирмы «BIO-RAD», Франция.

Анализ специфичности иммуночипа и определение уровня cut off был проведен на представительном клиническом материале из 400 образцов сывороток крови, в том числе от здоровых доноров ( $n=300$ ), а также от лиц, инфицированных парентеральными гепатитами ( $n=80$ ) и от лиц с аутоиммунными заболеваниями ( $n=20$ ). Дополнительно была изучена иммунореактивность 20 сывороток стандартной панели ГИСК им.Л.А.Тарасевича, не содержащих антител к ВИЧ 1 и 2 типов и антиген р24 (ОСО 42-28-214-02П, серия 15).

### **Результаты**

Определены методологические подходы для конструирования тест-системы в формате иммуночипа для дифференциальной серологической диагностики маркеров ВИЧ-инфекции, позволяющей отдельно выявлять не только антитела к спектру антигенов ВИЧ 1 и 2 типов, но и детектировать содержание антигена р24 в исследуемом материале.

Экспериментальная тест-система продемонстрировала 100% чувствительность на панели из 300 образцов сывороток крови ВИЧ-инфицированных лиц. Наиболее часто (46%) выявляли антитела к ВИЧ 1 типа следующего спектра: gp160, gp 120, gp 41, p24, pol. Определение антител к двум гликопротеинам в сочетании с антителами к p24 и/или pol было выявлено при анализе 124 образцов, что составило 41,3%. В 38 сыворотках крови выявлена положительная иммунореактивность к одному гликопротеину - gp 41 - в сочетании с антителами к p24 и pol. Российским Центром по борьбе и профилактики со СПИД регламентировано, что результат подтверждения в иммунном блоте при наличии данного спектра антител к ВИЧ считается положительным.

Изучение конечного титра антител ряда позитивных селективных сывороток продемонстрировало более высокую чувствительность разработанного препарата в формате иммуночипа по сравнению с коммерческими ИФА-тест-системами.

Чувствительность в отношении выявления антигена р24 составила 10 пг/мл. В настоящее время продолжается работа, направленная на повышение чувствительности теста с использованием моноклональных антител от различных производителей. Свободный антиген р24 детектировался нами в 76 сыворотках крови ВИЧ-инфицированных лиц из 300 исследуемых.

Анализ специфичности показал, что 398 образцов из 400 были определены нами как негативные по антителам и антигену р24. Один образец продемонстрировал неопределенный спектр антител (положительный результат к p24 и pol). Следует отметить, что иммунореактивность данной сыворотки была также положительной и в тест-

системе «ДС-ИФА-ВИЧ-АГ+АТ» (НПО «Диагностические системы», г.Н.Новгород). При анализе в иммуночипе другого дискордантного образца был установлен положительный результат только в отношении антител к р24. В тест-системе «ДС-ИФА-ВИЧ-АГ+АТ» данный образец был отрицательным. Однако в иммунном блоттинге «ЛИА ВИЧ 1/2» (ЗАО «Ниармедик плюс», г.Москва) на уровне 1+ была отмечена специфическая полоса, соответствующая детекции антител к р24.

Специфичность разрабатываемой тест-системы в формате иммуночипа на панели из 20 сывороток стандартной панели ГИСК им.Л.А.Тарасевича (ОСО 42-28-214-02П) – 100%.

Таким образом, высокая чувствительность и специфичность экспериментальной тест-системы в формате иммуночипа свидетельствуют о перспективности ее применения в практическом здравоохранении, как на стадии скрининга, так и на заключительном подтверждающем этапе серологической диагностики маркеров ВИЧ-инфекции.