

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ)

Обзор ВИЧ-инфекции и рекомендаций по диагностике (по данным CDC и APHL, 2018 г.)

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) относится к роду *Lentivirus* семейства *Retroviridae*. Его основной мишенью являются CD4+ Т-лимфоциты. При отсутствии лечения инфекция может привести к синдрому приобретенного иммунодефицита (СПИД) — состоянию, характеризующемуся тяжелым иммунодефицитом, повышенной восприимчивостью к оппортунистическим инфекциям и некоторым типам рака.

Согласно «Краткому справочнику» 2018 г. от Центров по контролю и профилактике заболеваний США (CDC) и Ассоциации общественных здравоохранительных лабораторий (APHL), первичное лабораторное тестирование на ВИЧ должно проводиться с помощью иммуноанализа на определение антигена/антител, одобренного американским регулятором FDA. Такой анализ предназначен для детекции как антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2, так и антигена p24 ВИЧ-1, что позволяет выявлять как установившуюся инфекцию (ВИЧ-1/ВИЧ-2), так и острую фазу ВИЧ-1 инфекции.

Если первоначальный скрининговый тест дает положительный результат, должно быть проведено дополнительное исследование с помощью дифференцирующего теста на антитела для подтверждения наличия ВИЧ-инфекции и различения типов вируса: ВИЧ-1 и ВИЧ-2. Этот этап критически важен для обеспечения точной диагностики и назначения соответствующей терапии (1).

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

- **Отслеживание ВИЧ-инфекции в целевых группах населения для сдерживания эпидемии ВИЧ.**
- **Раннее выявление и лечение для улучшения качества жизни.**

Структура вириона ВИЧ и диагностическая роль gp120, gp41, gp36 и p24/p26

Структура вирусной частицы ВИЧ-1 и ВИЧ-2 схожа. Вирион имеет сферическую форму диаметром приблизительно 120 нм и окружен богатой липопротеинами мембраной, полученной от клетки-хозяина. Как и у других ретровирусов, геном ВИЧ содержит три основных гена — *gag*, *env* и *pol*, — которые кодируют ключевые структурные и функциональные белки вируса.

Ген *gag* кодирует несколько внутренних структурных белков, наиболее важным из которых является капсидный белок p24, формирующий нуклеокапсид и служащий важным ранним маркером ВИЧ-инфекции. ВИЧ-1 экспрессирует антиген p24, тогда как ВИЧ-2 экспрессирует гомологичный белок, который обычно называют антигеном p24, хотя в научной литературе его также можно встретить под названием антиген p26 ВИЧ-2.

Ген *env* кодирует гликопротеины оболочки:

У ВИЧ-1 ген *env* кодирует белок-предшественник gp160, который расщепляется на гликопротеины оболочки gp120 и gp41, расположенные на поверхности вируса. gp120 связывается с CD4-рецепторами Т-клеток хозяина, инициируя проникновение вируса, в то время как gp41 заякоривает gp120 на вирусной мембране и участвует в слиянии вируса с клеткой хозяина. И gp120, и gp41 индуцируют высокий иммунный ответ, что делает их идеальными мишенями для тестов на ВИЧ.

У ВИЧ-2 ген *env* кодирует белок-предшественник gp160, который расщепляется на поверхностный гликопротеин gp120 и трансмембранный гликопротеин gp36, причем последний функционально аналогичен gp41 в ВИЧ-1.

Наконец, ген *pol* кодирует ферменты, необходимые для репликации вируса, включая обратную транскриптазу, интегразу и протеазу.

Классификация ВИЧ и географическое распространение

ВИЧ-1 подразделяется на четыре группы — М, N, O и P. Группа М является наиболее распространенной и включает множество генетических подтипов (А, В, С, D, F, G, H, J, K), а также циркулирующие рекомбинантные формы (CRF). На группу O (Outlier) приходится примерно 1-2% случаев инфицирования ВИЧ-1. Несмотря на то, что распространённость ВИЧ-1 группы O остается низкой (1- 2%) в Камеруне, ее выявление в ряде европейских стран (Франция, Испания, Бельгия) указывает на необходимость дополнительного наблюдения. Разнообразии последовательностей между штаммами ВИЧ-1 группы O и группы М значительно и достигает 50% и 30% в генах *env* и *pol* соответственно. Такое разнообразие затрудняет диагностику, мониторинг и лечение пациентов, инфицированных группой O. Из-за наличия мутации С181 в ферменте обратной транскриптазы (RT) у группы O, более 60% людей, живущих с этим вирусом, сталкиваются с проблемой лекарственной устойчивости к некоторым антиретровирусным терапиям (2).

Группы N и P крайне редки. ВИЧ-2 включает восемь известных групп, обозначенных буквами от А до H, причем группы А и В являются основными и наиболее широко распространенными группами. Группы С–H же считаются редкими (см. Таблицу 1).

Маркеры раннего выявления ВИЧ и критерии эффективности IVDR для тестов на антиген p24

РНК ВИЧ можно обнаружить через 7–10 дней после инфицирования, антиген p24 — через 10–15 дней, а антитела к ВИЧ, как правило, становятся детектируемыми в течение 2–8 недель после заражения (3). Комбинированное тестирование на антиген p24 и антитела к ВИЧ позволяет сократить период “серологического окна” примерно до 14 дней. Согласно нормативным требованиям Евросоюза для изделий IVDR класса D, нижний предел обнаружения (LoD) для международного стандарта ВОЗ по ВИЧ-1 p24 (код NIBSC: 90/636) должен составлять ≤ 2 МЕ/мл, а специфичность анализа должна быть $\geq 99,5\%$. Таким образом, чувствительность и специфичность детекции антигена p24 ВИЧ имеют критическое значение.

Моноклональные антитела, специфичные к p24, для разработки иммуноанализов на ВИЧ

Компания Хайтест предлагает ряд моноклональных антител (МоАт) к ВИЧ p24, которые могут быть использованы для

разработки иммуноанализов нового поколения для детекции антигена p24 ВИЧ или комбинированных тестов к антигенам/антителам ВИЧ.

Анализ чувствительности на платформе ИХЛА с использованием международного стандарта ВОЗ по ВИЧ-1 p24 (код NIBSC: 90/636) показывает, что рекомендуемые пары способны достичь аналитической чувствительности 0,5–0,64 МЕ/мл, что превышает требования, установленные правилами ЕС IVDR класса D (4). Подробная информация о рекомендуемых парах антител и соответствующих данных по LoD представлена в Таблице 2. В наших тестовых условиях рекомендуемые пары также продемонстрировали более высокую способность к детекции реагентов ВИЧ-1 p24 и ВИЧ-2 p26 по сравнению с антителами, используемыми в анализах Abbott и Roche. Кроме того, испытания на внешних клинических образцах показывают, что специфичность прототипов тест-систем превышает 99,95%, что соответствует клиническим требованиям.

Помимо этого, для платформы сэндвич-ИФА мы рекомендуем пары для иммунодетекции ВИЧ p24, представленные в Таблице 3. Все рекомендуемые пары прошли валидацию согласно стандартам компании Хайтест внутренними методами и продемонстрировали высокую специфичность в иммуноанализах сэндвич-ИФА.

Все рекомендуемые пары антител к ВИЧ p24 способны распознавать международный стандарт ВОЗ, который является эталоном антигена p24 ВИЧ-1 (код NIBSC: 90/636), а также следующие подтипы ВИЧ-1: А1, В, С, D, F1/CRF12_BF/BF, G, CRF20_BG, CRF01_AE, CRF02_AG, H и группу O (код NIBSC: 16/210). Они также распознают международный стандарт ВОЗ, который является эталоном антигена p26 ВИЧ-2 (код NIBSC: 16/236). Эти данные указывают на то, что представленные антитела распознают общие эпитопы (или консервативные фрагменты) неидентичных белков p24 (ВИЧ-1 p24 группы М, группы O, p26 ВИЧ-2). Репрезентативные калибровочные кривые для пар GA17 (захват) - GA12 (детекция) и GA17 (захват) - GA54 (детекция) представлены на Рисунке 1.

Все пары способны детектировать международный стандартный материал ВОЗ по ВИЧ-1 p24 (код NIBSC: 90/636), рекомбинантный антиген ВИЧ-1 p24 и рекомбинантный антиген ВИЧ-2 p26.

Таблица 1.

Обзор классификации ВИЧ.

| Тип вируса | Группа | Распространённость | Ключевые характеристики | Географическое распространение |
|------------|--------|------------------------------------|---|---|
| ВИЧ-1 | М | Наиболее распространённый | Содержит множество подтипов (А, В, С, D, F, G, H, J, K) и множество циркулирующих рекомбинантных форм (CRF) | Во всех регионах мира |
| | О | ~1% случаев | Генетически отличающийся («Outlier») | Преимущественно в Камеруне и соседних странах |
| | N | Чрезвычайно редкий | Ограниченная циркуляция | Преимущественно в Камеруне |
| | P | Чрезвычайно редкий | Наименее охарактеризованный | Мало данных |
| ВИЧ-2 | A&B | Наиболее распространённый из ВИЧ-2 | Распространён повсеместно | Преимущественно в Западной Африке |
| | C-H | Редкий | Имеет ограниченное распространение | Единичные случаи, главным образом в Западной Африке |

Таблица 2.

Пары антител к ВИЧ p24: Предел обнаружения (LoD).

Подготовка образцов: международный стандартный материал ВОЗ по ВИЧ-1 p24 (код NIBSC: 90/636),

антиген ВИЧ-1 p24 (группа M), антиген ВИЧ-1 p24 (группа O) и антиген ВИЧ-2 p26.

Метод детекции: сэндвич-хемилюминесцентный анализ (метка — щелочная фосфатаза).

Рекомендуемые пары продемонстрировали более высокую способность детекции реагентов ВИЧ-1 p24 и ВИЧ-2 p26 по сравнению с антителами, используемыми в анализах Abbott и Roche.

| Захватывающие МоАг | Детектирующие МоАг | LoD международного стандарта ВОЗ p24, МЕ/мл | LoD ВИЧ1 p24_М, пг/мл | LoD ВИЧ1 p24_О, пг/мл | LoD ВИЧ2 p26, пг/мл |
|--|--------------------|---|-----------------------|-----------------------|---|
| GA17 | GA54 | 0.55 | 4 | 1.5 | 15 |
| GA17 | GA12 | 0.64 | 2 | 2 | 8 |
| GA17 | GA38 | 0.55 | 1.5 | 1.5 | 8 |
| GA34 | GA54 | 0.5 | 2 | 1.5 | 20 |
| GA38 | GA54 | 0.55 | 4 | 1.5 | 20 |
| Набор реагентов Abbott Alinity HIV Ag/Ab | | 1.0 | 5 | 4 | н/д, когда уровень ВИЧ-2 p26 составляет 1 нг/мл |
| Набор реагентов Roche CombiPT HIV | | 1.3 | 5 | 6 | 20 |

Таблица 3.

Рекомендуемые пары для иммунодетекции ВИЧ p24 на платформе сэндвич-ИФА.

| Захватывающие МоАг | Детектирующие МоАг |
|--------------------|--------------------|
| GA17 | GA12 |
| GA15 | GA18 |
| GA18 | GA12 |
| GA32 | GA18 |
| GA32 | GA15 |

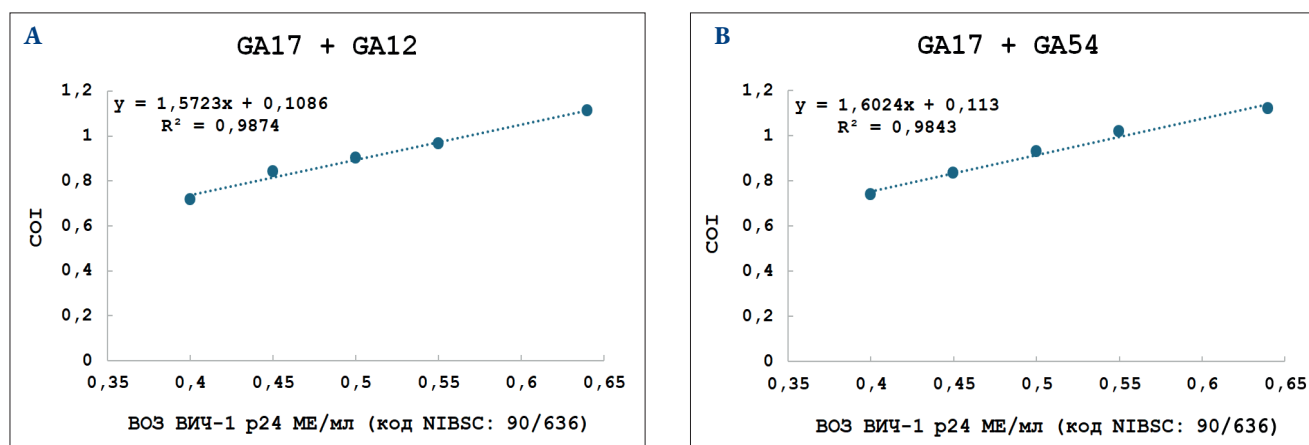


Рисунок 1.

Репрезентативные результаты для двух пар антител: GA17 (захват) - GA12 (детекция) (А), GA17 (захват) - GA54 (детекция) (Б) для детекции международного стандартного материала ВОЗ по ВИЧ-1 p24 (единица измерения: COI).

Метод детекции: сэндвич-хемилюминесцентный анализ (метка — щелочная фосфатаза).

Рекомбинантные антигены для детекции IgM/IgG ВИЧ-1/ВИЧ-2

Хайтест также предлагает панель антигенов для детекции ВИЧ-1/ВИЧ-2 - специфических антител IgM/IgG. При инфицировании разные антитела появляются в разное время (5). Антитела к gp41 появляются одними из первых при заражении ВИЧ-1. Они часто обнаруживаются в течение 2–3 недель после заражения, что делает gp41, как и gp36, ценной мишенью для ранней диагностики. Антитела к gp120 (V3-петли), как правило, появляются на более поздней стадии, хотя V3-регион является высоко иммуногенным. Для обеспечения полного и надежного диагностического охвата, антигены Хайтест содержат иммунодоминантные и консервативные регионы, такие как gp41, V3-фрагмент gp120 (ВИЧ-1) и gp36 (ВИЧ-2). Эти антигены были отобраны с учетом раннего иммунотвора, высокой иммуногенности и их способности имитировать генетическое разнообразие ВИЧ-1 (группы М и О, подтипы, CRF) и ВИЧ-2.

Кат. № 8Н12, ВИЧ-1, gp41-gp120 N-Fc — рекомбинантный антиген, экспрессированный в клеточной линии млекопитающих, имеющий теоретическую молекулярную массу 66 кДа. Антиген сконструирован путем слияния последовательностей gp120 и gp41, специфичных для групп М и О. В такой конструкции представлены эпитопы из обеих субъединиц env с целью выявления антител различной специфичности к разным штаммам ВИЧ-1.

Fc-метка была добавлена к N-концу белка для увеличения растворимости и последующей очистки.

Кат. № 8Н13, ВИЧ-1, gp41 N-HSA — рекомбинантный антиген, экспрессированный в клеточной линии млекопитающих, имеющий теоретическую молекулярную массу 87 кДа. Белок основан на последовательности gp41 ВИЧ-1 группы М, сконструирован с белковой меткой (HSA) и His-меткой для повышения растворимости белка и его очистки, соответственно.

Кат. № 8Н16, ВИЧ-1, gp120 C-Fc — рекомбинантный антиген, экспрессированный в клеточной линии млекопитающих, теоретическая молекулярная масса которого составляет 33,3 кДа. Для решения проблемы высокого разнообразия последовательностей gp120, конструктор включает два фрагмента, соответствующих V3-региону группы М и группы О, в рамках единого фьюжн-белка. Белок содержит C-концевой Fc-фрагмент для повышения растворимости белка и облегчения его очистки.

Кат. № 8Н24, ВИЧ-2, gp36 N-HSA — рекомбинантный антиген, экспрессированный в клеточной линии млекопитающих, имеющий теоретическую молекулярную массу 86,6 кДа. Белок основан на последовательности gp36 ВИЧ-2, сконструирован с белковой меткой (HSA) и His-меткой для повышения растворимости белка и его очистки, соответственно.

Кат. № 8Н25, ВИЧ-2, gp36 C-TnC — рекомбинантный антиген, экспрессированный в клеточной линии млекопитающих, имеющий теоретическую молекулярную массу 37,6 кДа. Белок основан на последовательности gp36 ВИЧ-2, сконструирован с белковой меткой (TnC) и His-меткой для повышения растворимости белка и его очистки, соответственно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Centers for Disease Control and Prevention and Association of Public Health Laboratories. 2018 Quick reference guide: Recommended laboratory HIV testing algorithm for serum or plasma specimens. Published January 27, 2018.
- AIDS Rev 2015, HIV-1 Group O Origin, Evolution, Pathogenesis, and Treatment: Unraveling the Complexity of an Outlier 25 Years Later, Shannon Bush, Denis M Tebit)
- Branson, Bernard M. et al. (2014). Laboratory testing for the diagnosis of HIV infection : updated recommendations.
- European Commission. Commission Implementing Regulation (EU) 2022/1107 of 4 July 2022 laying down common specifications for certain class D in vitro diagnostic medical devices. Official Journal of the European Union, L 174, 4 July 2022, pp. 3–42. At <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX%3A32022R1107> >
- The Antibodiome—Mapping the Humoral Immune Response to HIV. Audrey L. Butler, Stephanie Fischinger, Galit Alter. Published in Current HIV/AIDS Reports, 2019

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

| Название продукта | Кат. № | Клон | Изотип | Примечания |
|-------------------|--------|------|--------|---|
| ВИЧ 1/2 p24 | 3Н24 | GA12 | IgG1 | <i>In vitro</i> , ИХЛА, ИФА, мышинное антитело |
| | | GA15 | IgG1 | <i>In vitro</i> , ИХЛА, ИФА, мышинное антитело |
| | | GA17 | IgG1 | ИХЛА, ИФА, мышинное антитело |
| | | GA18 | IgG1 | <i>In vitro</i> , ИХЛА, ИФА, мышинное антитело |
| | | GA32 | IgG | ИХЛА, ИФА, рекомбинантное кроличье антитело |
| | | GA34 | IgG | ИХЛА, ИФА, рекомбинантное кроличье антитело |
| | | GA38 | IgG | ИХЛА, ИФА, рекомбинантное кроличье антитело |
| | | GA39 | IgG | ИХЛА, ИФА, рекомбинантное кроличье антитело |
| | | GA54 | IgG1 | ИХЛА, ИФА, химерное рекомбинантное крысиное антитело с человеческим константным доменом |

АНТИГЕНЫ

| Название продукта | Кат. № | Чистота | Источник |
|---|--------|---------|----------------|
| Антиген вируса иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1, gp41-gp120 N-Fc) | 8Н12 | >80% | Рекомбинантный |
| Антиген вируса иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1, gp41 N-HSA) | 8Н13 | >80% | Рекомбинантный |
| Антиген вируса иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1, gp120 C-Fc) | 8Н16 | >90% | Рекомбинантный |
| Антиген вируса иммунодефицита человека 2 (ВИЧ-2, gp36 N-HSA) | 8Н24 | >90% | Рекомбинантный |
| Антиген вируса иммунодефицита человека 2 (ВИЧ-2, gp36 C-TnC) | 8Н25 | >90% | Рекомбинантный |

Новинка!

Новинка!