

Верификация ВИЧ-инфекции: иммуноблот, как подтверждающий тест.

Северо-западный
государственный
медицинский университет им.
И.И. Мечникова,
кафедра инфекционных
болезней.

Кирпичникова Г.И.

Принципы тестирования на ВИЧ

- Дотестовое консультирование
- Информированное согласие
- Послетестовое консультирование

цели:

- *Оценить степень риска и ВИЧ-статус*
- Принять обоснованное решение о тестировании
- Повысить настороженность и способность защищать себя и других людей от инфекции

Тестирование на ВИЧ –основной компонент любой стратегии профилактики ВИЧ- инфекции

- **Анонимное** (код больного, фамилия неизвестна, сбор эпид. данных).
- **«Номинальное»** (с указанием имени, сбор эпид. данных).
- **«Не номинальное»** (с указанием кода, в направлении код, но фамилия больного известна врачу, сбор эпид. данных)

ВОЗ. Стратегии тестирования на ВИЧ

- ***Скрининг донорской крови***
(результаты используются для диагностики)
- ***Эпиднадзор за превалентностью ВИЧ-инфекции***
(результаты не используются для диагностики)
- ***Диагностика ВИЧ-инфекции***

Методы лабораторной диагностики

ВИЧ-инфекции

Иммунохимические

- ИФА:

антитела

p24-антиген

- иммуноблот

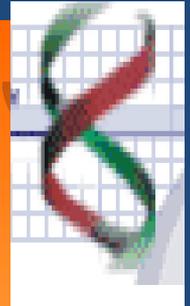


Молекулярные

- детекция
РНК и ДНК

- вирусная
нагрузка

- генотипирование,
определение
устойчивости



Выявление антител и латентный период (1)

- Специфические антитела появляются вскоре после инфицирования, однако точное время их появления зависит от макроорганизма и штаммовых особенностей вируса.
- Антитела присутствуют на ранних стадиях инфекции, но их концентрация очень низка – ниже предела чувствительности т/с.

Продолжение (2)

- При использовании т/с **1-го** поколения антитела обнаруживали через 6-12 недель после инфицирования.
- Т/С новых поколений (**4-го**) обнаруживают антитела через 2-4 недели после инфицирования.
- **IgM** на ранних стадиях определять сложно, предпочтительней **IgM+IgG** (т/с 3-го поколения)

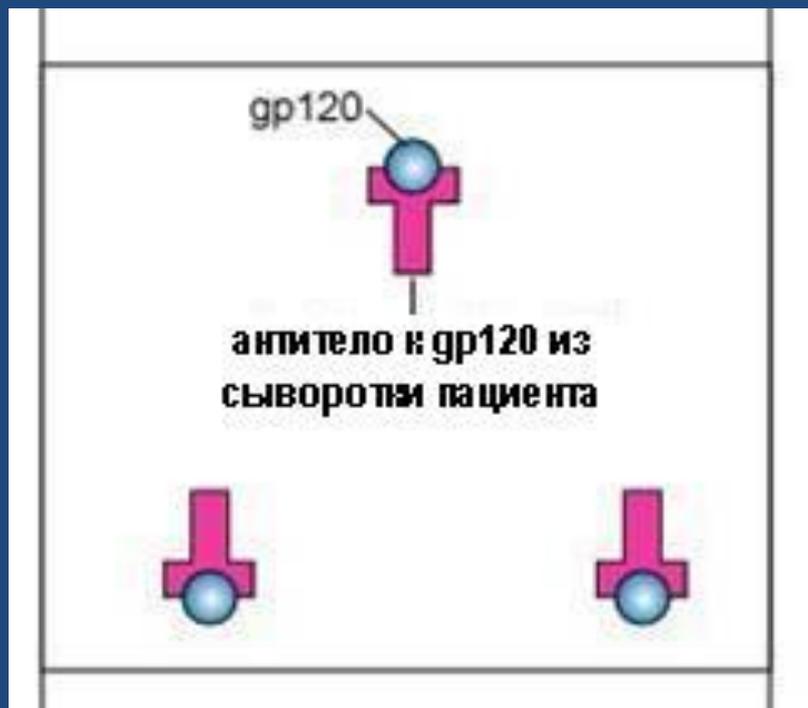
Сроки появления антител

- Антитела к ВИЧ появляются у 90-95% зараженных в течение 3-х месяцев после заражения.
- 5-9% - через 6 месяцев
- 0,5 -1% - в более поздние сроки
- Наиболее ранний срок обнаружения антител 2 недели.

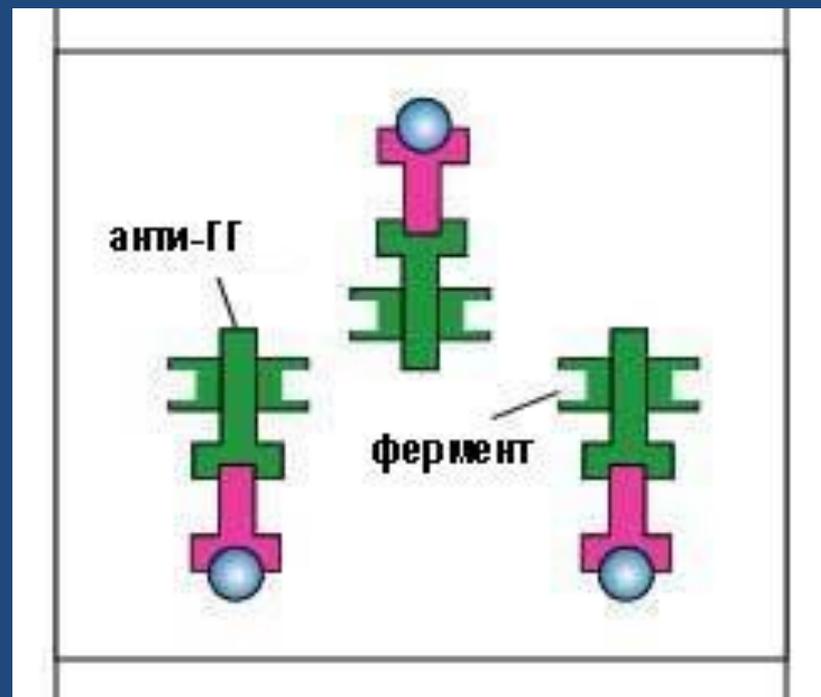
(Покровский В.В с соавт.)

Иммуноблотт (ИБ)

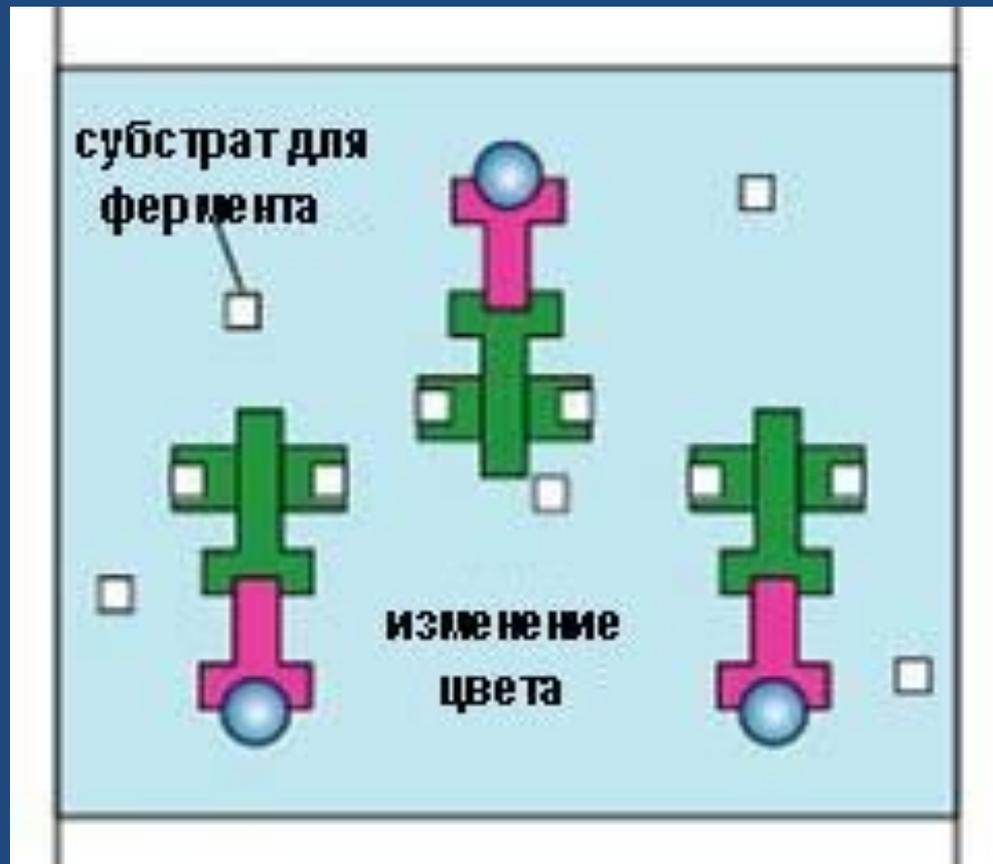
- *Принцип метода, применение, значение:*
- *ИБ относится к твердофазному иммунохимическому анализу (См. слайд 10, 11).*



Мембрану инкубируют с сывороткой пациента. Если в ней имеются антитела к любому известному антигену ВИЧ, они свяжутся с ними на мембране. Остальные антитела будут удалены при отмывании.



В лунку добавляют связанные с ферментом анти-ГГ. Фермент находится в комплексе с антителом. Анти-ГГ свяжутся со всеми антителами класса IgG, образовавшими комплексы с антигенами ВИЧ. Все свободные анти-ГГ отмываются.



Добавляют субстрат для фермента, связанного с анти-ГГ. Реакция фермента с субстратом приводит к видимому изменению цвета. Это свидетельствует о наличии в сыворотке пациента антител к известным антигенам ВИЧ, нанесенным на мембрану. Если таких антител в сыворотке нет, связанные с ферментом анти-ГГ отмываются на предыдущих этапах и цвет при добавлении субстрата не меняется, поскольку субстрату не с чем взаимодействовать.

Иммуноблоттинг

- Иммуноблоттинг дает положительные реакции **позже**, чем ИФА выявляет сероконверсию; в большинстве случаев положительные результаты в ИБ удастся получить к 6-му месяцу.
- Необходимо получить положительную реакцию по крайней мере с двумя белками продуктами гена *env* ВИЧ:
 - gp160, gp120 и gp41 – продукты гена *env*;
 - p55, p24 и p17 – продукты гена *gag*;
 - p68, p52 и p34 – продукты гена *pol*.

Иммуноблот

Является
подтверждающим тестом

Используется только
в сочетании с двумя ИФА

Интерпретация:

«-» - нет полос

«+» - gp41 + gp120/160

или p24 + gp120/160

«результат неопределенный» -

любые другие варианты

gp160

gp120

p66

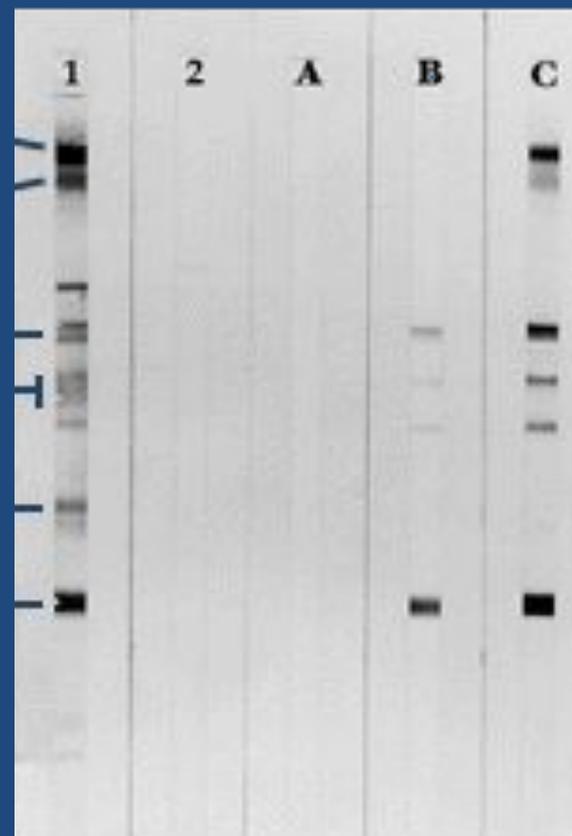
p51

gp41

p31

p24

p17



Интерпретация результатов (1).

- Положительный результат ИФА плюс слабая или сомнительная реакция при иммуноблоттинге (особенно на **полосы gag**) – **признак недавнего заражения.**
- Слабая реакция на полосы **env** и **выраженная** – **на полосы pol** позволяет предполагать инфекцию, вызванную ВИЧ, не принадлежащим к подтипу В.

GR41 – зона неравномерного окрашивания

- Зона gr41 состоит из нескольких полос, соответствующих белкам с молекулярной массой от 39 до 46 кДа
- Зона, соответствующая gr41, может выглядеть как одна неравномерно окрашенная полоса
- **Диффузное** распределение белков в данной зоне обусловлено разными электрофоретическими свойствами углеводного компонента гликопротеиновой молекулы
- Типичные антитела к gr41 связываются со всеми gr41, фиксированными в данной зоне.
- **Равномерное** окрашивание или наличие отдельных полос в данной зоне может быть обусловлено антителами к невирусным белкам (из культуры клеток, в которых выращивают вирус), также присутствующим на тест-полоске, и интерпретируется как

Белки ВИЧ-1 и ВИЧ-2, определяемые в ИБ.

ГЕН	ВИЧ-1 мол.масса в (кД)	ВИЧ-2 Мол. масса в (кД)
ENV	Gp160, gp120, gp41	Gp140, gp105, gp36
GAG	P55, p24, p17	P56, p26 p16
POL	P66, p51, p31	P68, p34

Продолжение ...

- При получении **сомнительного** результата с антителами к белкам сердцевины с антигенами **ВИЧ-1** проводится исследование с антигенами **ВИЧ-2**.
- При получении **положительного** результата выдается заключение о наличии антител к ВИЧ в исследуемом материале.
- При получении **отрицательного** результата (когда нет никаких антител) выдается заключение об отсутствии

Контроль постановки ИБ

- Использовать только лицензированные коммерческие диагностические наборы (по возможности)
- Строго следовать инструкциям, прилагаемым к диагностическим наборам
- Выполнять процедуры внешнего контроля для обеспечения стабильности качества получаемых результатов
- Не использовать контаминированные тест-полоски
- Не инкубировать тест-полоски с субстратом слишком долго
- Если образец отвечает критериям отказа от проведения исследования, запросить новый образец для исследования
- В отчете об исследовании следует указывать всю диагностически значимую информацию

Сравнение чувствительности и специфичности ИФА и ИБ

- ИФА является более чувствительным методом по сравнению с ИБ.
- ИБ - более специфичным по сравнению с ИФА.
- Поэтому положительный результат в ИБ выявляется позже.

Скрининг и верификация ВИЧ-инфекции.



ВОЗ рекомендует

- повторное тестирование через 2 недели, 1-6 месяцев. При этом повторную сыворотку и исходную исследуют одновременно в одних условиях.
- Иногда неопределенные результаты сохраняются годы и эти лица не являются инфицированными.
- Лица на стадии СПИДа могут терять антитела и тоже ИБ становится сомнительным. В этом случае рекомендуется ПЦР и культивирование.

Модифицированный вестерн-блот.

- Позволяет дифференцировать инфекции, вызываемые ВИЧ-1 и ВИЧ-2.
- На н/ц мембране находятся вирусные лизаты ВИЧ-1 и синтетический пептид (ВИЧ-2 gp36/41).

Линейный иммунный анализ - альтернатива ИБ

- (LIA) – на нитроцеллюлозную полосу наносится **рекомбинантный антиген** или синтетический полипептид. Электрофорез не производится, при таком использовании «искусственных» антигенов отсутствует контаминация культуральными белками

Дилеммы при диагностике ВИЧ

- А) Неопределенные результаты в ИБ;
- Б) Минимально положительные результаты неинфицированных лиц.
- Д) Невоспроизводимые результаты при сравнении образцов.
- Г) Наличие технических ошибок.
- Д) Ложноотрицательные результаты (ВИЧ О)
- Е) Диагностика новорожденных

Благодарю за
внимание