

# 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*

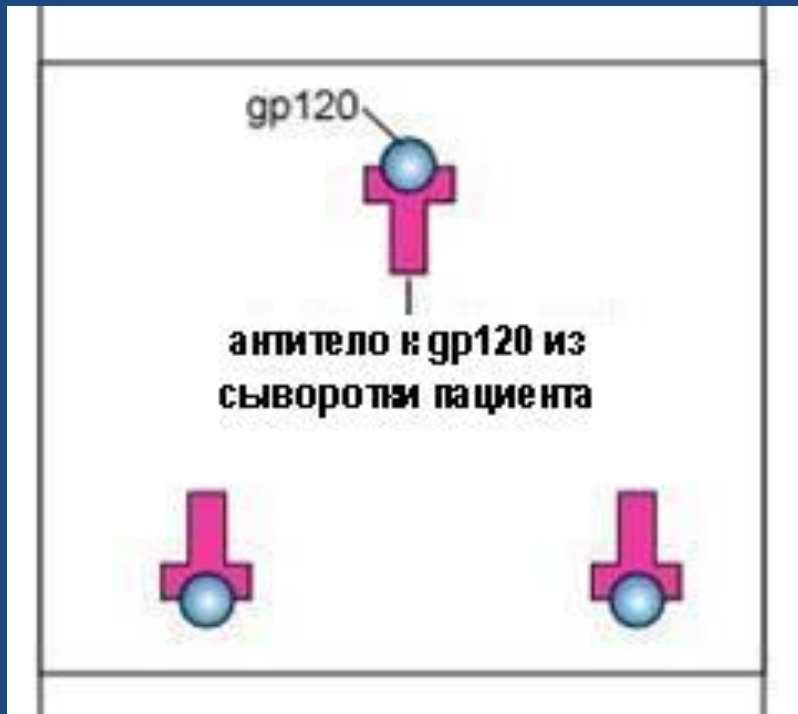
- Антитела к ВИЧ появляются у 90-95% зараженных в течение 3-х месяцев после заражения.
- 5-9% - через 6 месяцев
- 0,5 -1% - в более поздние сроки
- Наиболее ранний срок обнаружения антител 2 недели.

(Покровский В.В с соавт.)

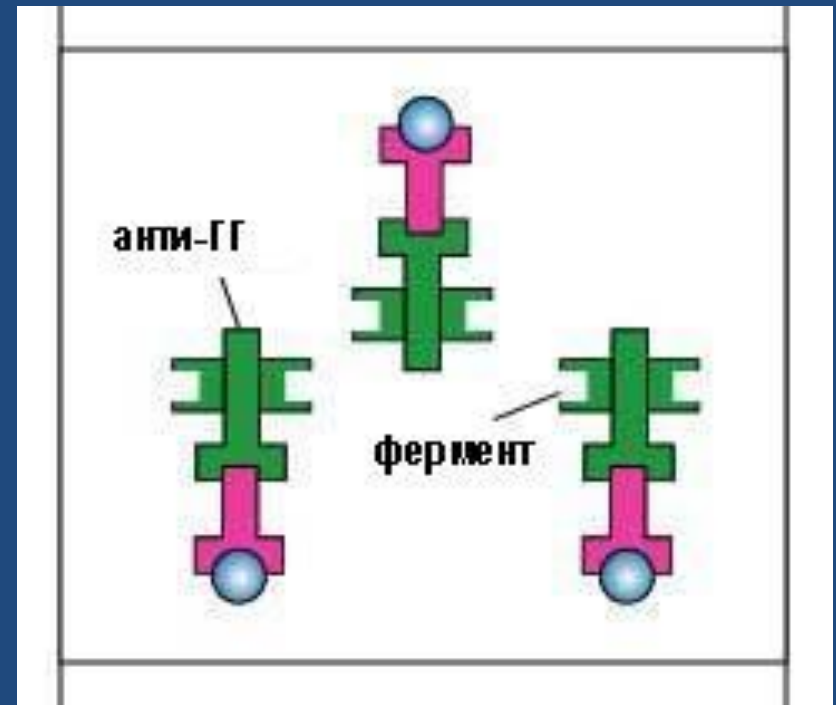


# *Иммуноблотт (ИБ)*

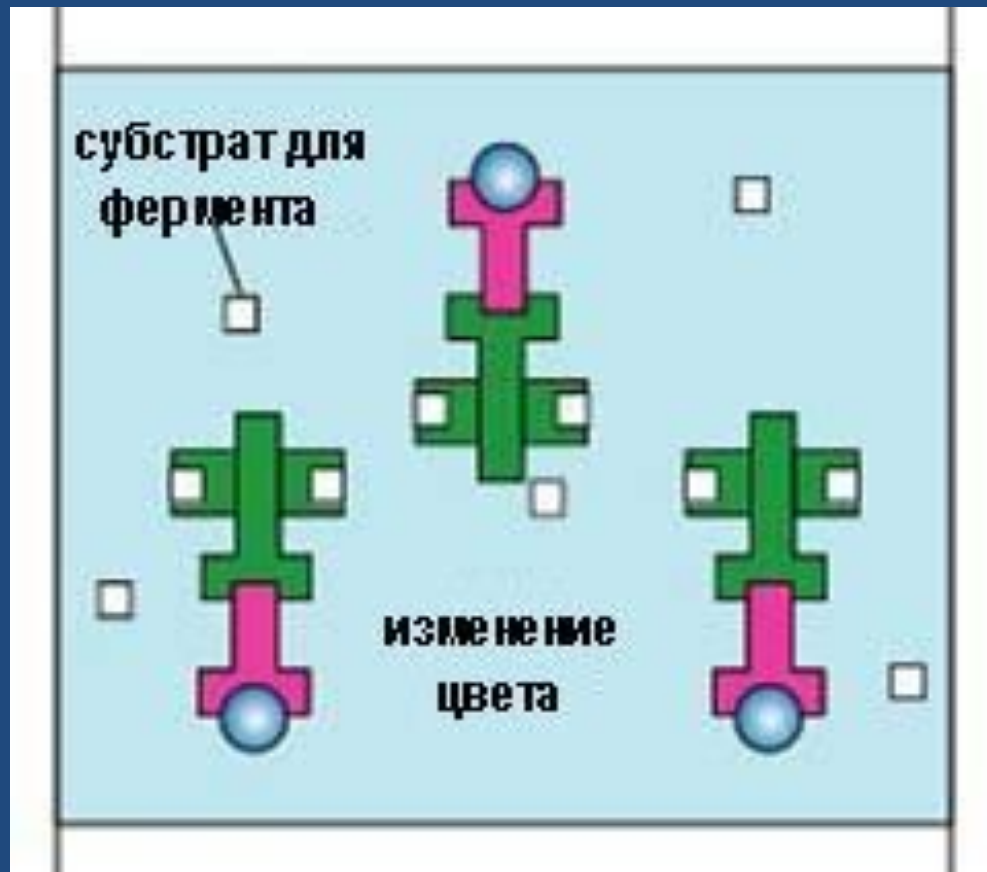
- *Принцип метода, применение, значение:*
- *ИБ относится к твердофазному иммунохимическому анализу (См. слайд 10, 11).*



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

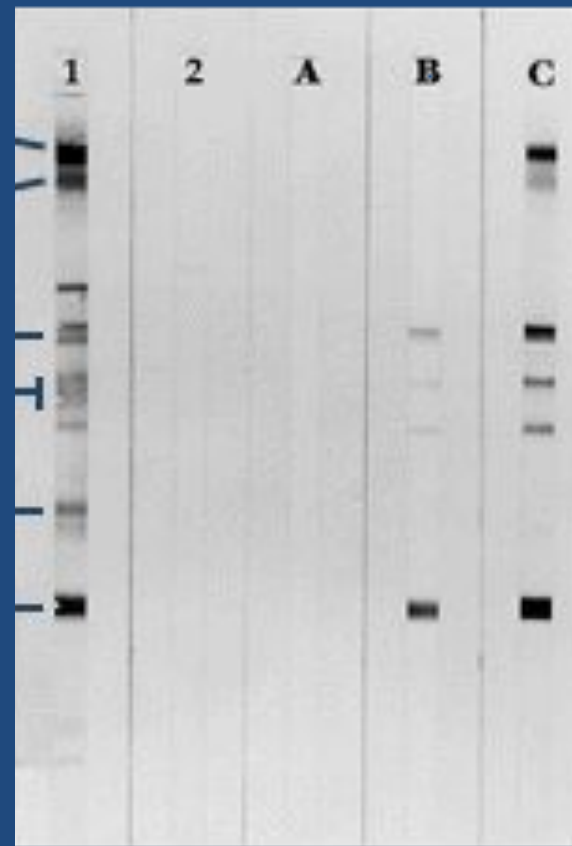
p51

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.

# GP41 – зона неравномерного окрашивания

- Зона gp41 состоит из нескольких полос, соответствующих белкам с молекулярной массой от 39 до 46 кДа
- Зона, соответствующая gp41, может выглядеть как одна неравномерно окрашенная полоса
- **Диффузное** распределение белков в данной зоне обусловлено разными электрофоретическими свойствами углеводного компонента гликопротеиновой молекулы
- Типичные антитела к gp41 связываются со всеми gp41, 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 полоску 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