

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО  
РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

---

**УТВЕРЖДАЮ**

**Заместитель министра здравоохранения  
и социального развития РФ**

  
\_\_\_\_\_  
**Р.А. ХАЛЬФИН**

« *05* » *июня* 2008 г.

**СМАРТ-туб™ HIV&HCV – НОВАЯ ВСПОМОГАТЕЛЬНАЯ  
ТЕХНОЛОГИЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИЧ и ВГС В СТАДИИ  
«СЕРОЛОГИЧЕСКОГО ОКНА»**

**Методические рекомендации**

**МОСКВА  
2008**

---

Методические рекомендации «СМАРТ-туб™ HIV&HCV» – новая вспомогательная технология для выявления антител к ВИЧ и ВГС в стадии «серологического окна» подготовлены в ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, ФГУЗ Головной центр гигиены и эпидемиологии ФМБА России и Московского городского центра профилактики и борьбы со СПИД Департамента здравоохранения города Москвы.

Разработчики методических рекомендаций –  
М.М. Гараев, С.А. Богдан, А.И. Мазус, А.Я. Ольшанский

### Аннотация

В методических рекомендациях представлены данные об использовании при лабораторной диагностике ВИЧ-инфекции и вирусного гепатита С на стадии «серологического окна» технологии «СМАРТ-туб™ HIV&HCV».

Указанная технология не заменяет существующие диагностические методы, а дополняет их, обеспечивая возможность более раннего выявления ВИЧ-инфекции и вирусного гепатита С с применением «золотого» стандарта диагностики, ИФА/иммуноблот, решая их главную проблему - сокращение «серологического окна».

Методические рекомендации предназначены для специалистов центров профилактики и борьбы со СПИДом, гепатологических центров и отделений, специалистов профильных научно-исследовательских и лечебных учреждений.

## **СМАРТ-туб™ HIV&HCV – НОВАЯ ВСПОМОГАТЕЛЬНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИЧ и ВГС В СТАДИИ «СЕРОЛОГИЧЕСКОГО ОКНА»**

### **1. Введение**

Эпидемическая ситуация по ВИЧ-инфекции и вирусному гепатиту С в России продолжает оставаться напряженной. Быстрый рост числа людей, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) делает эту инфекцию одной из наиболее серьезных проблем, стоящих перед системой здравоохранения страны и представляющих реальную опасность для населения. Не менее остро стоит проблема вирусного гепатита С, распространение которого в последние годы приобретает характер эпидемии.

Широко используемые лабораторные методы определения ВИЧ и ВГС инфекций, основаны на выявление антител к возбудителям с помощью ИФА. Эти тест-системы обеспечивают определение антител только после сероконверсии, которая наступает при ВИЧ инфекции на 4-6 неделю после инфицирования. Статистический анализ показывает, что через три месяца после инфицирования антитела обнаруживаются у 99,5% пациентов, а у 0,5% -сероконверсия наблюдается через 6 и более месяцев после инфицирования.

В отношении ВГС этот срок еще больше. У большинства инфицированных антитела можно обнаружить современными методами ИФА только через 3-6 месяцев.

Невозможность выявить инфекцию на ранних стадиях приводит к неверным диагнозам, искаженным эпидемиологическим данным и создает шанс для появления инфицированной крови и ее продуктов в банках крови.

В связи с этим создание и расширение арсенала методов, обеспечивающих раннюю диагностику этих инфекций, а также создание диагностических систем, направленных на сокращение «серологического окна», является крайне актуальной задачей для практического здравоохранения.

В этом направлении возможны несколько подходов. Один из них основан на создании диагностических препаратов способных одновременно детектировать вирусные антигены и противовирусные антитела. Второй – разработка приемов повышения чувствительности тест-систем для детекции антител. Особое место занимают диагностические препараты, способные выявлять вирусные нуклеиновые кислоты после их амплификации с использованием различных вариантов ПЦР.

В первом направлении имеется значительный прогресс - был создан целый ряд диагностических препаратов, так называемых «тест-систем четвертого поколения». Использование таких тест-систем позволяет тестировать заболевание на 12-14 день после инфицирования.

Генамплификационный анализ (NAT) также сокращает период «невывяляемости» ВИЧ-инфекции и гепатита С до 10-12 дней.

В тоже время, первичный гуморальный ответ иммунной системы на проникновение ВИЧ и ВГС в организм формируется уже к 4 дню от начала вирусемии. В течение этого периода происходит формирование плазматических клеток, способных вырабатывать антитела к ВИЧ и антитела к ВГС. Однако нарастание уровня синтеза противовирусных антител идет на фоне высоких концентраций вирусного антигена. Антитела образуют иммунные комплексы с вирусным антигеном, вследствие их детекция оказывается затрудненной. Помимо этого эффективный синтез противовирусных антител *in vivo* оказывается под супрессивным действием системы цитокинов, которые активируют в первую очередь клеточный противовирусный иммунитет. В связи с этим, если вывести вирус специфические плазматические В-лимфоциты из-под воздействия этих факторов, то уровень синтезированных антител может оказаться достаточным для их детекции с помощью стандартных ИФА тест-систем для определения антител к ВИЧ и ВГС.

Набор СМАРТ-тюб™ HIV&HCV позволяет проводить стимуляцию выработки антител сенсibilизированными В-клетками в условиях *in vitro* с дальнейшим выявлением синтезированных антител методами стандартного ИФА.

Настоящие методические рекомендации посвящены описанию работы набора СМАРТ-тюб™ HIV&HCV и результатов его лабораторных испытаний.

## **II. Современные методы диагностики и мониторинга ВИЧ - инфекции и вирусного гепатита С.**

1. Скрининговые тесты для определения Ат к ВИЧ-1,2, антигена (p24) ВИЧ-1, Ат к ВГС, основанные на использовании ИФА.

2. Подтверждающие тесты (метод иммуноблотинга)

- определение антител к отдельно сорбированным рекомбинантным Аг ВГС (сердцевины (core), NS3, NS4, NS5); нативным или рекомбинантным Аг ВИЧ-1 (gp160, gp120, gp41, p66, p55, p51, p40, p34, p24, p17).

3. Методы тестирования вирусного генома с помощью различных вариантов ПЦР (количественное и качественное определение РНК ВГС, его генотипирования, количественное и качественное определение РНК ВИЧ-1).

Описание методик.

## 1. Скрининговые тесты, основанные на принципах ИФА

### 1.1. Определение антител к ВИЧ - 1,2 и ВГС.

Диагностические тесты на выявление антител в крови методом иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA) широко используются, как «золотой стандарт» для диагностики ВИЧ-инфекции и вирусного гепатита С по всему миру и являются признанным методом для скрининга и диагностики ВИЧ-инфекции и вирусного гепатита С. Эти тесты хорошо изучены, контролируются и автоматизированы, откалиброваны и просты в использовании как в крупных, так и в небольших лабораториях.

### Ограничения

Обычный иммунный ответ, не подавленный иммуносупрессией, обеспечивает определяемый в крови уровень антител в пределах 5-7 дней после начала виремии. Однако, в условиях постоянно повышающихся концентраций антигена в результате репродукции вируса происходит активное снижение концентрации антител, за счет их включения в состав иммунных комплексов. Второй фактор приводящий к снижению концентрации антител - подавление гуморального звена иммунного ответа в результате синтеза набора цитокинов, стимулирующих клеточное звено иммунитета. Как следствие этого в течение инфекционного процесса наблюдается длительное «серологическое окно» от момента заражения до сероконверсии. При ВИЧ-инфекции проходит от 1 до 6 месяцев, а при вирусном гепатите С от 3 до 12 месяцев с момента заражения до момента появления в крови определяемого уровня антител.

На протяжении этого периода (то есть на ранних стадиях инфекции) у инфицированных людей даже самые чувствительные тест-системы на выявление антител будут давать отрицательный результат, и ВИЧ-инфекция будет пропущена.

### 1.2. Одновременное выявление антител к ВИЧ-1,2 и антигена ВИЧ-1(p24)

В настоящее время в нашей стране широко используются тест-системы четвертого поколения для диагностики ВИЧ-инфекции, которые позволяют одновременно выявлять антитела к ВИЧ-1,2 и антиген (p24) ВИЧ-1. Применение этих тест-систем позволило повысить чувствительность в сероконверсионных образцах и сократить период

«серологического окна» до 12-14 дней, поэтому эти тест-системы стали широко применяться для скрининга населения нашей страны, тем не менее, проблема ранней диагностики ВИЧ-инфекции остается актуальной.

## 2. Подтверждающие методы

Для подтверждения наличия ВИЧ-инфекции и вирусного гепатита С используются диагностические тесты, основанные на одной из модификаций твердофазного ИФА – иммуноблоте. Антигены ВИЧ или антигены ВГС после их разделения по молекулярной массе переносятся на специальные стриппы.

После получения положительных результатов в скрининговых тестах на ВИЧ или ВГС их необходимо подтвердить в иммуноблоте в соответствии с существующим стандартом лабораторной диагностики ВИЧ и ВГС - инфекций. Таким образом, подтверждающие тесты также позволяют нам определять антитела к ВИЧ-1,2 и ВГС, и имеют те же ограничения для использования в ранней диагностик ВИЧ и ВГС – инфекций, что и скрининговые тесты.

## 3. Генамплификационный анализ

Молекулярные технологии для обнаружения генетических последовательностей очень чувствительны и могут определить низкие уровни вируса в образце (обычно в крови). Они также могут быть откалиброваны для количественного анализа вируса. Они используются как прогностический и мониторинговый инструмент, особенно для контроля результатов лечения и отслеживания резистентных к лечению штаммов вирусов.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) широко используется, как основа генамплификационного анализа. ПЦР - это эффективный инструмент мониторинга инфекции у уже выявленных носителей ВИЧ, а также мониторинга эффективности антиретровирусной терапии. ПЦР также используется для определения подтипа вируса при эпидемиологических исследованиях.

В настоящее время метод ПЦР широко используется для повышения инфекционной безопасности трансфузионной терапии и признан как на федеральном, так и на региональном уровнях.

Научное обоснование

Для получения положительного результата методами NAT необходимо наличие в крови вируса в количествах, достаточных для обнаружения в момент исследования. Исследовательские ПЦР могут достигать чувствительности 1-5 копий/мл; коммерческие тест-системы имеют более высокий порог чувствительности - 20-200 копий/мл. Отрицательный результат свидетельствует о том, что в крови концентрация вируса ниже детектируемой, и на основании этого результаты теста будут отрицательны, хотя в других органах (например, ВГС в печени или ВИЧ в лимфатических узлах) могут протекать процессы активной репликации вирусов. Пропорция «пропущенных» ВИЧ-носителей зависит от продолжительности «серонегативного окна» и особенностей исследуемой популяции.

### Ограничения

Основные ограничения методов NAT связаны с тем, что для анализа используется только одна ткань пациента – кровь. В периоды, когда концентрация вируса в крови ниже пороговой, результаты теста будут отрицательны, несмотря на наличие активной инфекции в других органах. Другое ограничение использования методов NAT – это высокая генетическая изменчивость вирусных объектов, в частности ВИЧ-1 и ВГС. Мутации, появляющиеся в специфических местах посадки праймеров будут приводить к снижению чувствительности тест системы. Таким образом, ВИЧ-, и ВГС-инфекции в этих случаях могут быть пропущены.

Таким образом, существующие современные методы диагностики ВИЧ- и ВГС- инфекций не решают проблему раннего выявления этих патологий.

### III. Технология СМАРТ-тюб™ HIV&HCV

Исследования последних 14 лет привели к созданию технологии СМАРТ-тюб™ HIV&HCV, целью которой является сокращение длительности серонегативного окна для эффективного выявления ВИЧ- и ВГС- инфицированных лиц на ранних стадиях инфекции.

СМАРТ-тюб™ HIV&HCV - это устройство для предварительной инкубации крови *in vitro* с целью стимуляции выработки антител к ВИЧ и/или ВГС с последующим проведением стандартного диагностического теста ИФА на выявление антител.

СМАРТ-тюб™ HIV&HCV не заменяет существующие диагностические методы, а дополняет их, обеспечивая возможность более раннего выявления ВИЧ- и ВГС-инфекций с применением «золотого стандарта» диагностики

(ИФА - иммуноблота) и решая таким образом их главную проблему – сокращение «серологического окна».

#### Проблема «серологического окна»

«Серологическое окно», или период с момента заражения до момента, когда чувствительность тест-систем позволяет регистрировать антитела к ВИЧ или ВГС (сероконверсии), представляет собой одну из проблем диагностики ВИЧ и ВГС.

Как уже говорилось выше, при ВИЧ-инфекции «серологическое окно» может длиться до 6 месяцев и более и представляет собой период, когда инфицированные, но «серонегативные» люди инфекционны, и их кровь передает инфекцию возможным реципиентам. Такие инфицированные лица, с «отрицательным» результатом, полученным в существующих тестах, являются источником дальнейшего распространения инфекции. Несмотря на то, что пациентам с подозрением на ВИЧ- или ВГС-инфекцию рекомендуется проходить повторное обследование, практически существует лишь единичная возможность определить носителей ВИЧ и ВГС. Если они неверно диагностируются, как «отрицательные», их шанс на получение необходимой информации о постановке на учет, терапии и предотвращении распространения ВИЧ – инфекции упущен. Например:

1. Для беременной ВИЧ-инфицированной женщины ложноотрицательный результат теста будет означать, что ни ей, ни ребенку не будет проводиться лечение для предотвращения возможной перинатальной передачи инфекции.
2. Кровь доноров, переданная во время «серонегативного окна», заразит реципиентов, получивших эту инфицированную кровь.

#### IV/ Описание и работа СМАРТ-тюб™ HIV&HCV

##### 1. Назначение

СМАРТ-тюб™ HIV&HCV предназначен для предварительной подготовки образцов крови перед исследованием на наличие антител к ВИЧ или ВГС существующими зарегистрированными методами исследования. СМАРТ-тюб™ HIV&HCV, сам по себе, **НЕ ЯВЛЯЕТСЯ** диагностическим тестом. Это лишь пробирка с запатентованным составом, в которой небольшая проба крови инкубируется для активации выработки *in vitro* антител к ВИЧ или вирусу гепатита С перед стандартным исследованием на наличие специфических антител к ВИЧ и ВГС.



## 2. Как SMART-тюб™ HIV&HCV используется

SMART-тюб™ HIV&HCV очень прост в использовании и не требует дорогого и комплексного оборудования или обучения персонала. Это всего лишь инкубационная подготовка крови перед проведением обычных тестов на выявление антител к ВИЧ и ВГС.

SMART-тюб™ HIV&HCV используется следующим образом:

1. Забор крови должен быть произведен в пробирки с гепарином и перенесен в лабораторию в течение 20 часов при комнатной температуре (15°-20°С)
2. Один миллилитр крови либо напрямую берется в пробирку SMART-тюб™ HIV&HCV (там есть вакуум для забора нужного количества крови), либо переносится в нее стерильной пипеткой в диагностической лаборатории.
3. Верх пробирки SMART-тюб™ HIV&HCV частично откручивается, она помещается в 5%-ный CO<sub>2</sub> инкубатор и выдерживается 3-5 дней при температуре 37°С
4. SMART-тюб™ HIV&HCV вынимают из инкубатора, и образец надосадочной жидкости тестируют на наличие ВИЧ- или ВГС-антител существующими стандартными методами.

Преимущество инновационной технологии SMART-тюб™ HIV&HCV - простота ее использования. Забор крови можно проводить в полевых условиях. Единственным условием является использование в качестве антикоагулянта гепарина. Инкубацию крови в пробирках SMART-тюб™ HIV&HCV можно начать на следующий день после забора крови, когда образцы поступят в лабораторию. Поскольку это устройство для предварительной подготовки крови, после инкубации крови в SMART-тюб™ HIV&HCV она может быть протестирована на наличие ВИЧ- или ВГС-антител существующими методами. Поэтому лабораториям не нужно реорганизовывать сложившийся процесс диагностики инфекции, нужно лишь изменить процедуру подготовки крови к тестам. Все это делает SMART-тюб™ HIV&HCV очень простым в использовании и недорогим методом выявления ВИЧ- и ВГС-инфицированных лиц.

## 3. Механизм действия SMART-тюб™ HIV&HCV.

Иммунные клетки, ответственные за узнавание вируса и его белковых фрагментов, становятся «примированными» в момент самой первой встречи с вирусом. «Примированные» лимфоциты, специфичные для данного вируса,

появятся в крови уже через несколько дней после инфицирования и будут присутствовать там на протяжении всей инфекции. СМАРТ-тюб™ HIV&HCV стимулирует выработку антиВИЧ (и/или антиВГС) антител этими специфическими лимфоцитами, даже в условиях супрессии их активности в организме. Технология СМАРТ-тюб™ HIV&HCV способствует супер-стимуляции лимфоцитов, вызывая активную выработку антител *in vitro*. Результатом этой стимуляции является высокий уровень антител в инкубируемом образце, который может быть определен стандартными методами. За счет этого инкубация образцов крови в СМАРТ-тюб™ HIV&HCV позволяет получать положительного результата теста на наличие антител уже вскоре после инфицирования. Это позволяет обнаружить ВИЧ- и ВГС-инфекцию через обнаружение соответствующих антител даже у инфицированных, но серонегативных пациентов.

#### 4. Эффективность СМАРТ-тюб™ HIV&HCV

В любой момент, даже вскоре после инфицирования, тест на выявление антител, проведенный после инкубации крови в СМАРТ-тюб™ HIV&HCV, будет положителен. Положительный результат показывает наличие инфекции независимо от того в каком органе организма идет инфекционный процесс (например, ВГС в печени или ВИЧ в лимфатических узлах).

Подготовка (инкубация) крови в СМАРТ-тюб™ HIV&HCV с последующим проведением стандартного теста на выявление антител (ИФА) с использованием имеющихся и получивших распространение диагностикумов можно обнаружить инфекцию уже через неделю после заражения/инфицирования.

СМАРТ-тюб™ HIV&HCV эффективен со всеми штаммами ВИЧ и ВГС. Тест на выявление антител также независим от локализации вируса и может быть положителен на всем протяжении инфекции.

Эффективность СМАРТ-тюб™ HIV&HCV была подтверждена многочисленными клиническими исследованиями, в которых в совокупности принимали участие более 10000 пациентов.

#### 5. Ограничения метода:

СМАРТ-тюб™ требует свежесобранных образцов крови в пробирку с гепарином.

#### 6. Упаковка

Упаковка - 50 пробирок СМАРТ-тюб™ HIV&HCV в упаковке; 900 пробирок СМАРТ-тюб™ HIV&HCV в блоке.

#### 7. Хранение

Хранение SMART-тюб™ HIV&HCV должно производиться в холодильнике при температуре 2-8°C. Срок годности указан на каждой упаковке – 6 месяцев с момента производства.

## 8. Транспортировка

Транспортировка SMART-тюб™ HIV&HCV должно осуществляться в холодильнике при температуре 2-8°C.

## 9. Утилизация

SMART-тюб™ HIV&HCV стерилен, не токсичен, не коррозионный и безопасен для окружающей среды. Поэтому, нет необходимости утилизировать его каким-либо специальным способом.

Когда внутри SMART-тюб™ HIV&HCV находится образец крови, он должен быть утилизирован тем же способом, что и любой кровь содержащий контейнер, в соответствии с правилами безопасности лаборатории.

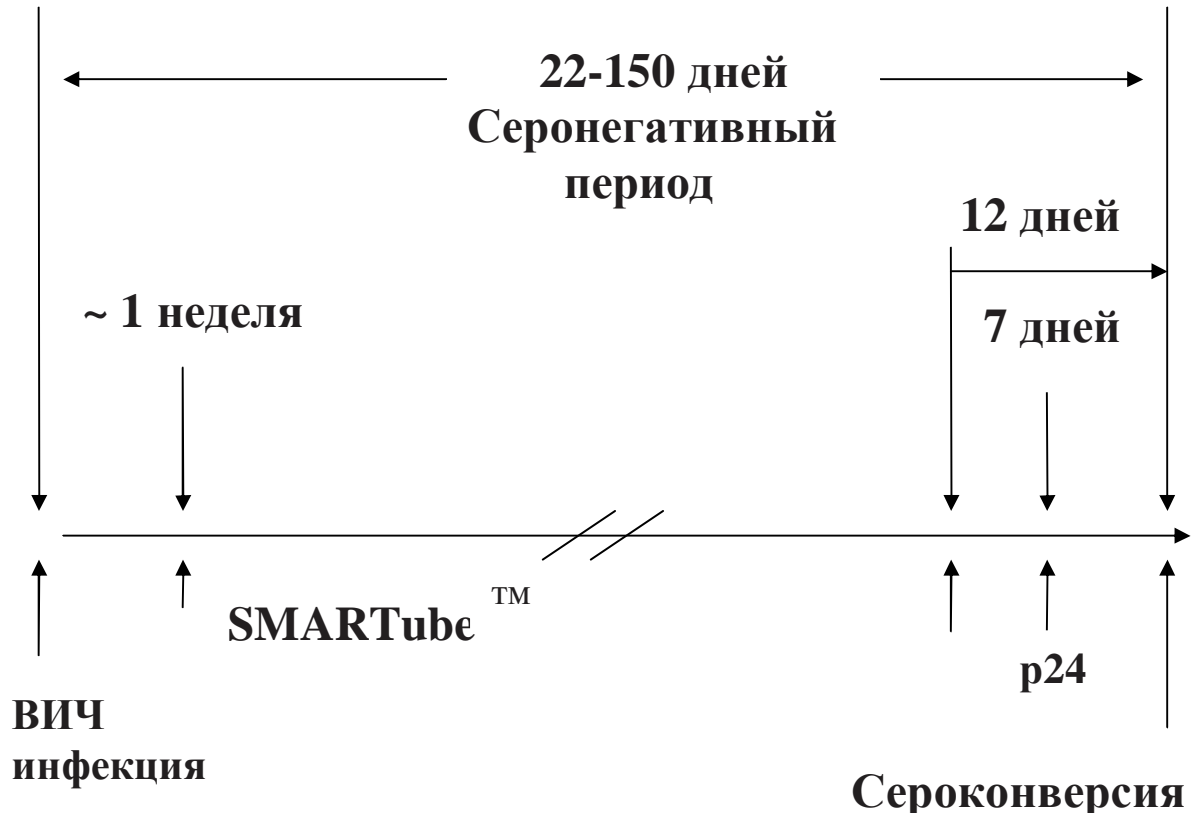
## 10. Сферы применения SMART-тюб™ HIV&HCV

SMART-тюб™ HIV&HCV предназначен для использования везде, где производится тестирование на наличие антител к ВИЧ и ВГС (а также там, где осуществляются направления на данные тесты).

Это включает: диагностические лаборатории, лечебные учреждения, места заключений, тестирование призывников (армия, милиция), граждан иностранных государств, прибывающих в Россию работать, страхование жизни и здоровья. В частности, использование SMART-тюб™ HIV&HCV, как устройства для предварительной подготовки крови, может быть введено для:

1. Тестирования беременных женщин. Некоторые из них могут находиться в стадии негативного окна по ВИЧ-инфекции или гепатиту С. Следовательно результаты тестирования будут ложноотрицательными, и им не будет вовремя проведена антиретровирусная терапия для предотвращения перинатальной передачи ВИЧ, снижающая вероятность передачи инфекции от матери ребенку с 25-30% до 2-8%.
2. Диагностика носителей ВИЧ в дозорных исследованиях групп высокого риска заражения для своевременной профилактики и лечения. 50% - 70% случаев новых ВИЧ-инфекций, переданных половым путем, вызваны лицами, не знающими о своей инфицированности ВИЧ, что делает этот пункт чрезвычайно важным в борьбе по предотвращению эпидемии ВИЧ.
3. Тестирование на ВИЧ призывников в армию, милицию.

4. Тестирование на ВИЧ и ВГС пациентов на диализ для предотвращения/снижения передачи этих вирусов посредством процесса диализа.
5. Применение в местах, где недоступны методы (NAT).



**Рисунок 1** – «Серологическое окно», когда наличие ВИЧ-инфекции не определяется существующими методами выявления антител и антигена, а также генамплификационным анализом (NAT)