

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БЕСПРИБОРНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ Т-ЛИМФОТРОПНОГО ВИРУСА

к. х. н. Дробченко С.Н., д. м. н. Рищук С.В., Масленникова И.И.

ЗАО «Биоград», Северо-западный медицинский университет им. И.И. Мечникова, ООО «Покровский банк стволовых клеток», Санкт-Петербург

Т-лимфотропный вирус I типа (HTLV-I) может приводить к неопластической трансформации клеток человека и к двум тяжелым заболеваниям: Т-клеточному лейкозу-лимфоме взрослых и тропическому спастическому парапарезу. В отличие от ВИЧ, который может передаваться с бесклеточным материалом, Т-лимфотропный вирус человека передается при переливании клеточных компонентов крови. В этом году опубликована работа Группы Английских ученых, под руководством профессора лондонского Импириэл-колледжа Чарльз Бэнгема подтверждающая, что инфицированный этим вирусом лимфоцит совмещает в себе и инкубатор, и транспортное средство. Такие лимфоциты срываются с места, перемещаются к еще не оккупированным кровяным клеткам и делятся с ними вирусными частицами. В отличие от онкогенных ретровирусов животных, Т-лимфотропный вирус человека типа 1 не содержит онкогенов, а его трансформирующие свойства связывают с белком Tax. Белок Tax - единственный вирусный белок, обычно присутствующий в опухолевых клетках.

Инфицирование HTLV пожизненное, поэтому во многих развитых странах обследование доноров на HTLV является обязательным. В рекомендациях ВОЗ от 2009 года (Screening Donated Blood for Transfusion-Transmissible Infections, Recommendations) указано обязательное обследование на HTLV доноров, происходящих из эндемичных регионов, или имевших половые контакты с лицами из этих регионов. В США, в Японии, в 11 странах Евросоюза, включая Великобританию и Францию, проводится обязательный скрининг донорской крови и ее компонентов на HTLV. При этом в России до сих пор отсутствуют требования по обязательному обследованию донорской крови на HTLV.

Приказ Минздравсоцразвития РФ № 325 от 25 июля 2003 года «О развитии клеточных технологий в Российской Федерации» обязывает банки стволовых клеток проводить тестирование на антитела к HTLV I и II при поступлении образца. Европейские стандарты безопасности приготовления и использования компонентов крови (2001 г.) также обязывают исследовать образцы на наличие антител к HTLV.

В данной работе обобщены результаты тестирования на наличие антител к HTLV I и II в 4 городах России за 2010-2011годы. В Москве в лабораториях КДЛ тест, Гемотест было исследовано 8 875 образцов пуповинной крови рожениц, в Санкт-Петербурге в Покровском банке стволовых клеток были исследованы 3 465 образцов пуповинной крови, в Ханты-Мансийске 660 образцов периферической плазмы рожениц исследовались Югорским НИИ клеточных технологий, в Краснодаре в ККБ1 им.Очаповского были исследованы 160 образцов плазмы. В Инвитро лаборатории Санкт-Петербурга было исследовано 4860 образцов крови пациентов, в том числе от онкологических больных и наркозависимых.

Исследование клеточных трансплантатов на наличие антител к HTLV I и II проводилось с помощью ИФА тест-систем ИммуноКомб® II HTLV I&II, производства Орженикс ЛТД, Израиль. В ИФА тест – системах ИммуноКомб использована технология последовательной сорбции на твердую фазу – Гребень вирусоспецифических рекомбинантных антигенов оболочки и ядра (gp21, gp46 и p19, p24) HTLV I, II, что обеспечивает высокую специфичность -97%. Специально подобранная реакция связывания с использованием фосфатазно-щелочного конъюгата позволяет достичь 100% чувствительности. Французское агентство по контролю за медикаментами (АДА), оценивая тесты, разрешенные для использования в клиниках Европы, подчеркивает, что использование фосфатазно-щелочного конъюгата позволяет достичь наиболее высокой чувствительности по сравнению с тестами, основанными на пероксидазной реакции.

При проведении анализа 10 мкл сыворотки, плазмы или цельной крови человека вносят в ячейки ряда А Проявочной Ванны и приводят ее в контакт с твердой фазой – Гребнем. Затем Гребень переносят из ряда в ряд Проявочной Ванны и через 37 минут получают результат в виде окрашенных точек. Результат учитывается визуально или автоматизировано на приборе КомбСкан. Один набор

ИммуноКомб рассчитан на 36 определений. Для индивидуального тестирования Гребень можно согнуть и отломить необходимое количество зубцов. При этом в Проявочной Ванне вскрывается только необходимое количество ячеек (соответствующее числу зубцов). Невскрытые ячейки и неиспользованные зубцы хранятся в течение срока годности тест-системы.

Клинические испытания тест-системы ИммуноКомб® II HTLV I&II были проведены в Израиле, Колумбии и Ямайке. Чувствительность теста ИммуноКомб® II HTLV I&II определялась на 254 сыворотках положительных по HTLV. Результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1. Чувствительность теста ИммуноКомб® II HTLV I&II.

Тип HTLV	Количество образцов	Результат ИммуноКомб® II HTLV I&II	
		Отрицательный	Положительный
HTLV I	111	0	111
HTLV II	50	0	50
HTLV I&II (неизвестный тип)	93	0	93
Итого	254	0	254

Чувствительность тест-системы ИммуноКомб® II HTLV I&II составила **100%**

Специфичность теста ИммуноКомб® II HTLV I&II определялась на 537 образцах, отрицательных по референс-тесту на HTLV. Результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2. Специфичность теста ИммуноКомб® II HTLV I&II

Группы обследуемых	Количество образцов	ИммуноКомб® II HTLV I&II		Специфичность %
		Отрицательны	Положительный	
Доноры, область низкого уровня распространенности HTLV	100	98	2	98
Доноры, область высокого уровня распространенности HTLV	102	102	0	100
Онкологические пациенты	206	195	11	94,6
Пациенты с аутоиммунными заболеваниями	15	15	0	100
Группа высокого риска (принимающие наркотики и т.п.)	65	62	3	95,3
Имеющие другие инфекционные заболевания (ВИЧ, гепатит А, гепатит В, СМВ, Эпштейн-Барр вирус)	36	36	0	100
Пациенты, подозреваемые на наличие HTLV, отрицательные по серологическим тестам.	13	13	0	100
Итого	537	521	16	97

Специфичность – 97%

Проведенные исследования показали, что

1. ИммуноКомб® II HTLV I&II выявил все положительные образцы, демонстрируя 100% чувствительность.

2. Все подтвержденные отрицательные образцы, так же определялись как отрицательные в тесте ИммуноКомб® II HTLV I&II.
3. ИммуноКомб® II HTLV I&II может дать незначительную перекрестную реакцию у онкологических пациентов, наркозависимых. Специфичность теста составила 97%.
4. ИммуноКомб® II HTLV I&II определяет HTLV- 1 так же хорошо, как и HTLV-2.
5. ИммуноКомб® II HTLV I&II не дает перекрестных реакций с образцами от пациентов, инфицированных ВИЧ, гепатитами, ЦМВ, вирусом Эпштейн-Барра.
6. ИммуноКомб® II HTLV I&II достоверно определяет HTLV в зонах низкого и высокого уровня распространенности.

Таким образом, выбранные для обследования тест-системы чувствительные и высокоспецифичные. В 13160 образцах пуповинной и периферической крови рожениц положительных результатов выявлено не было, данные образцы предназначались для заготовки стволовых клеток. В 4 860 образцах крови пациентов из Северо-Западного региона, было выявлено 9 положительных результатов, из которых 6 подтвердилось в иммуноблоте.

Анализ проведенных обследований показал, что антитела к HTLV I&II выявляются всего у 0,03%, при этом положительные образцы отсутствовали у беременных женщин. Если рассматривать только группу пациентов из Северо-Западного региона, то процент выявляемости HTLV I&II составит 0,1%.

Т-лимфотропный вирус человека широко распространен в юго-западной части Японии и на острове Окинава, где заражено более 1 млн человек. Очаги инфекции обнаружены и в других странах Востока (например, на Тайване), в странах Карибского бассейна, включая северо-восточную часть Южной Америки, в Центральной Африке, Италии, Израиле, в Арктике, в юго-восточной части США. Важно отметить, что в странах Европейского сообщества основными группами риска являются работники сферы сексуальных услуг, венерологические больные, потребители инъекционных наркотиков, пациенты, нуждающиеся во множественных переливаниях крови, а также дети, рождающиеся от инфицированных матерей. Инъекционные наркоманы относительно часто заражаются не только ВИЧ, но и Т-лимфотропным вирусом человека типа 1 и 2. Как показывают обследования доноров крови на антитела к этому вирусу, в США инъекционная наркомания является основной причиной заражения им. В некоторых группах инъекционных наркоманов в США антитела к Т- лимфотропному вирусу человека типа 1 или 2 были выявлены более чем у 10% обследованных. По данным двух исследований, при одновременном наличии инфекции, вызванной любым из типов этого вируса и [ВИЧ-инфекцией](#), последняя протекает быстрее и раньше заканчивается смертью.

Близость дальневосточных районов России к эндемичным по HTLV регионам (Японии), а также увеличение миграции населения, изменениями в сексуальном поведении, диктует необходимость обследования населения России на Т-лимфотропный вирус человека типа 1 и типа 2. Для чего необходимо обследование на Т-лимфотропный вирус, если данный вирус неизлечим: для выявления серопозитивных носителей, которые не должны становиться донорами и для предотвращения дальнейшего распространения инфекции. Использование тест-систем ИммуноКомб® II HTLV I&II для этих целей позволит быстро и надёжно определить инфицированность HTLV-I и HTLV-2.