

СУЧАСНА ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА

МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ВИЧ-ІНФЕКЦІЇ

О.І. Гетьман, к. мед. н.

/Асоціація превентивної і антиїдджинг медицини, Київ/

Внастоящее время новые диагностические технологии позволяют выявить этиологические и патогенетические причины многих заболеваний и коренным образом повлиять на результаты лечения. Пожалуй, наиболее впечатляющие результаты внедрения этих технологий в клиническую практику достигнуты в области иммунологии и диагностики инфекционных заболеваний.

Тест-системы на основе иммуноферментного и иммунохемилюминесцентного анализа позволяют выявить антитела различных классов, что значительно повышает информативность методов клинической, аналитической чувствительности и специфичности для диагностики инфекционных заболеваний. Следует отметить, что наиболее значительные успехи в диагностике инфекций связаны с внедрением в лабораторную практику метода полимеразной цепной реакции, который считается «золотым стандартом» в диагностике и оценке эффективности проведенного лечения ряда инфекционных заболеваний.

Для исследования может быть использован различный биологический материал: сыворотка, плазма крови, соскоб, биопат, плевральная или спинномозговая жидкость (СМЖ). В первую очередь, методы лабораторной диагностики инфекций направлены на выявление таких заболеваний, как вирусный гепатит В, С, D, цитомегаловирусная инфекция, инфекции, передающиеся половым путем (гонорейная, хламидийная, микоплазменная, уреоплазменная), туберкулез, ВИЧ-инфекция и др.

ВИЧ-инфекция – заболевание, вызываемое вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), длительное время персистирующего в лимфоцитах, макрофагах, клетках нервной ткани, в результате чего развивается медленно прогрессирующее поражение иммунной и нервной систем организма, проявляющееся вторичными инфекциями, опухолями, подострым энцефалитом и другими патологическими изменениями.

Возбудители инфекции – вирусы иммунодефицита человека 1-го и 2-го типов (ВИЧ-1, ВИЧ-2) – относятся к семейству ретровирусов, подсемейству медленных вирусов. Вирионы являются сферическими частицами диаметром 100–140 нм. Вирусная частица имеет наружную фосфолипидную оболочку, включающую гликопротеиды (структурные белки) с определенной молекулярной массой, измеряемой в килодальтонах. У ВИЧ-1 – это gp160, gp120, gp41. Внутренняя оболочка вируса, покрывающая ядро, также представлена белками с известной молекулярной массой – p17, p24, p55 (ВИЧ-2 содержит gp140, gp105, gp36, p16, p25, p55).

В состав генома ВИЧ входит РНК и фермент обратная транскриптаза (ревертаза). Для того чтобы геном ретровируса соединился с геномом клетки хозяина, вначале с помощью ревертазы происходит синтез ДНК на матрице вирусной РНК. Затем ДНК провируса встраивается в геном клетки-хозяина. ВИЧ обладает выраженной антигенной изменчивостью, значительно превышающей таковую у вируса гриппа.

В организме человека основной мишенью ВИЧ являются Т-лимфоциты, несущие на поверхности наибольшее количество CD4-рецепторов. После проникновения ВИЧ в клетку с помощью ревертазы по образцу своей РНК вирус синтезирует ДНК, которая встраивается в генетический аппарат клетки-хозяина (CD4-лимфоциты) и остается там пожизненно в состоянии провируса. Помимо Т-лимфоцитов-хелперов поражаются макрофаги, В-лимфоциты, клетки нейроглии, слизистой оболочки кишечника и некоторые другие клетки. Причиной снижения количества Т-лимфоцитов (клетки CD4) является не только прямое цитопатическое действие вируса, но и их слияние с неинфицированными клетками. Наряду с поражением Т-лимфоцитов у больных с ВИЧ-инфекцией отмечается поликлональная активация В-лимфоцитов с увеличением синтеза иммуноглобулинов всех классов, особенно IgG и IgA, и последующим истощением этого отдела иммунной системы. Нарушение регуляции иммунных процессов проявляется также повышением уровня α -интерферона, β_2 -микроглобулина, снижением уровня IL-2. В результате нарушения функции иммунной системы, особенно при снижении числа Т-лимфоцитов (CD4) до 400 клеток в 1 мкл крови и менее, возникают условия для неконтролируемой репликации ВИЧ со значительным увеличением количества вирионов в различных средах организма. В результате поражения многих звеньев иммунной системы человек, зараженный ВИЧ, становится беззащитным перед возбудителями различных инфекций. На фоне нарастающей иммунодепрессии раз-



виваются тяжелые прогрессирующие заболевания, которые не встречаются у человека с нормально функционирующей иммунной системой. Это заболевания, которые Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) определила как СПИД-маркерные или СПИД-индикаторные заболевания.

СПИД-индикаторные заболевания

Первая группа – заболевания, присущие только тяжелому иммунодефициту (уровень CD4 <200). Клинический диагноз ставится при отсутствии анти-ВИЧ-антител или ВИЧ-антигенов.

Вторая группа – заболевания, которые могут развиваться как на фоне тяжелого иммунодефицита, так и в ряде случаев без него. Поэтому в этих случаях необходимо лабораторное подтверждение диагноза.

Первая группа:

- кандидоз пищевода, трахеи, бронхов;
- внелегочный криптококкоз;
- криптоспоридиоз с диареей более 1 месяца;
- цитомегаловирусные поражения различных органов помимо печени, селезенки или лимфоузлов у больного в возрасте старше 1 месяца;
- инфекция, обусловленная вирусом простого герпеса, проявляющаяся язвами на коже и слизистой оболочке, которые персистируют более 1 месяца, а также бронхитом, пневмонией или эзофагитом любой продолжительности, поражающим больного в возрасте старше 1 месяца;
- генерализованная саркома Капоши у больных в возрасте до 60 лет;
- лимфома головного мозга (первичная) у больных в возрасте до 60 лет;
- лимфоцитарная интерстициальная пневмония и/или легочная лимфоидная дисплазия у детей в возрасте до 12 лет;
- диссеминированная инфекция, вызванная атипичными микобактериями (микобактерии комплекса *M. avium-intracellulare*) со внелегочной локализацией или локализацией (дополнительно к легким) в коже, шейных лимфатических узлах, лимфатических узлах корней легких;
- пневмоцистная пневмония;
- прогрессирующая многоочаговая лейкоэнцефалопатия;
- токсоплазмоз головного мозга у больных в возрасте старше 1 месяца.

Вторая группа:

- бактериальные инфекции, сочетанные или рецидивирующие, у детей в возрасте до 13 лет (более двух случаев за 2 года наблюдения): сепсис, пневмония, менингит, поражение костей или суставов,

абсцессы, обусловленные гемофильными палочками, стрептококками;

- кокцидиоидомикоз диссеминированный (внелегочная локализация);
- ВИЧ-энцефалопатия (ВИЧ-деменция, СПИД-деменция);
- гистоплазмоз с диареей, персистирующей более 1 месяца;
- изоспороз с диареей, персистирующей более 1 месяца;
- саркома Капоши в любом возрасте;
- лимфома головного мозга (первичная) у лиц любого возраста;
- другие В-клеточные лимфомы (за исключением болезни Ходжкина) или лимфомы неизвестного иммунофенотипа: мелкоклеточные лимфомы (типа лимфомы Беркитта и др.); иммунобластные саркомы (лимфомы иммунобластные, крупноклеточные, диффузные гистиоцитарные, диффузные недифференцированные);
- микобактериоз диссеминированный (не туберкулез) с поражением помимо легких кожи, шейных или прикорневых лимфоузлов;
- туберкулез внелегочной (с поражением внутренних органов, помимо легких);
- сальмонеллезная септицемия, рецидивирующая;
- ВИЧ-дистрофия (истощение, резкое похудение).

В таблице 1 приведены СПИД-индикаторные заболевания и их этиологические агенты.

Существует много классификаций СПИДа. Согласно новой классификации, предложенной Центром по контролю за заболеваниями в США (табл. 2), диагноз СПИДа устанавливается лицам, имеющим уровень CD4-лимфоцитов менее 200/мкл даже при отсутствии СПИД-индикаторных заболеваний.

Категория А включает бессимптомных ВИЧ-серопозитивных лиц, лиц с периферической генерализованной лимфаденопатией, а также острой первичной ВИЧ-инфекцией.

Категория В включает различные синдромы, важнейшие из которых – бациллярный ангиоматоз, орофарингеальный кандидоз, рецидивирующий кандидозный вульвовагинит, трудно поддающийся терапии, цервикальная дисплазия, цервикальная карцинома, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, листериоз, периферическая нейропатия.

Антитела к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 в крови

Антитела к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 в сыворотке крови в норме отсутствуют.

Определение антител к ВИЧ является основным методом лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции. В основе метода лежит иммуноферментный анализ (ИФА) – чувствительность более 99,5%, специфичность – более 99,8%. Антитела к ВИЧ появляются у 90–95%

инфицированных в течение 1 месяца после заражения, у 5–9% – через 6 месяцев, у 0,5–1% – в более поздние сроки. В стадии СПИДа число антител может снижаться вплоть до полного исчезновения.

Результат исследования выражается качественно: положительный или отрицательный.

Отрицательный результат исследования указывает на отсутствие антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 в сыворотке крови. Отрицательный результат лаборатория выдает сразу по его готовности. При получении положительного результата – выявлении антител к ВИЧ – во избежание ложноположительных результатов в лаборатории анализ повторяют еще 2 раза. Вне зависимости от полученных результатов исследования проба крови пациента и результаты 3 исследований направляются лабораторией в региональный центр СПИДа для подтверждения положительного результата или верификации неопределенного результата. В таких случаях окончательный ответ по данному исследованию выдает региональный центр СПИДа.

Иммуноблоттинг на антитела к вирусным белкам ВИЧ в сыворотке крови

Антитела к вирусным белкам ВИЧ в сыворотке крови в норме отсутствуют.

Метод ИФА по определению антител к ВИЧ является скрининговым. При получении положительного результата для подтверждения его специфичности используется метод иммуноблоттинга – Western-blot – встречная преципитация в геле антител в сыворотке крови больного с различными вирусными белками, подвергнутыми разделению по молекулярной массе с помощью электрофореза и нанесенными на нитроцеллюлозу. Определяются антитела к вирусным белкам gp41, gp120, gp160, p24, p18, p17 и др.

Согласно рекомендациям Российского центра по профилактике и борьбе со СПИДом обнаружение антител к одному из гликопротеидов gp41, gp120, gp160 – следует считать положительным результатом. В случае выявления антител к другим белкам вируса результат считается сомнительным, такого пациента следует обследовать дважды – через 3 и 6 месяцев. Отсутствие антител к специфическим белкам ВИЧ означает, что иммуноферментный метод дал ложноположительный результат. Вместе с тем, в практической работе при оценке результатов метода иммуноблоттинга необходимо руководствоваться инструкцией, прилагаемой фирмой к используемому «Набору для иммуноблоттинга».

Метод иммуноблоттинга применяется для лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции.



Антиген р24 в сыворотке крови

Антиген р24 в сыворотке крови в норме отсутствует.

Антиген р24 представляет собой белок стенки нуклеотида ВИЧ. Стадия первичных проявлений после инфицирования ВИЧ является следствием начала репликативного процесса. Антиген р24 появляется в крови спустя 2 недели после инфицирования и может быть выявлен методом ИФА в период от 2 до 8 недель. Через 2 месяца от момента инфицирования антиген р24 исчезает из крови. В дальнейшем в клиническом течении ВИЧ-инфекции отмечается второй подъем содержания в крови белка р24. Он приходится на период формирования СПИДа. Существующие тест-системы ИФА для детекции антигена р24 используются для раннего обнаружения ВИЧ у доноров крови и детей, определения прогноза течения СПИДа и контроля проводимой терапии у больных СПИДом. ИФА обладает высокой аналитической чувствительностью, что позволяет обнаруживать антиген р24 ВИЧ-1 в сыворотке крови в концентрации 5–10 пкг/мл и ВИЧ-2 – менее 0,5 нг/мл, и специфичностью. Однако следует отметить, что уровень антигена р24 в крови подвержен индивидуальным вариациям, а это значит, что только 20–30% пациентов могут быть выявлены с помощью данного исследования в ранний период после инфицирования (Rose N.R. et al., 1997).

Антитела к антигену р24 классов IgM и IgG в крови появляются со 2-й недели, достигают пика в течение 2–4 недель и удерживаются на таком уровне различное время: антитела класса IgM – в течение нескольких месяцев, исчезая в течение одного года после инфицирования, а антитела IgG могут сохраняться годами.

Алгоритм диагностики ВИЧ-инфекции зависит от фазы заболевания и характеризуется изменением динамики детекционных антител различных классов (рис. 1, 2).

Результат исследования выражается качественно – положительный или отрицательный. Отрицательный результат исследования указывает на отсутствие антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 и антигена р24 в сыворотке крови. Отрицательный результат лаборатория выдает сразу по его готовности. При получении положительного результата – выявлении антител к ВИЧ-1 и ВИЧ-2 и/или антигена р24 – во избежание ложноположительных результатов в лаборатории анализ повторяют еще 2 раза. Вне зависимости от полученных результатов исследования проба крови пациента и результаты 3 исследований направляются лабораторией в региональный центр СПИДа для подтверждения положительного результата или верификации неопределенного результата. В таких случаях окончательный ответ по

Таблица 1. Вторичные инфекции, выявляемые у пациентов с ВИЧ

Уровень CD4 Т-клеток в 1 мкл крови	Этиологический агент	Клинические проявления	
Незначительное снижение	Вирус папилломы человека	Кондиломы	
	Вирус <i>Herpes simplex</i>	Рецидивирующие язвы	
	Вирус <i>Herpes zoster</i>	Кожные высыпания	
	Вирус гепатита В	Персистентная антигенемия	
	Вирус гепатита С	Хронический гепатит	
	Вирус гепатита D	Хронический гепатит	
	<i>Rochalimaea henselae</i>	Бациллярный ангиоматоз	
	<i>Encapsulated bacteria</i>	Синусит	
	<i>Candida spp.</i>	Стоматит, вагинит	
	<i>Coccidioides immitis</i>	Пневмония	
<500	Вирус Эпштейна–Барр	Ротовая волосатоклеточная лейкоплакия, лимфома	
	Вирус простого герпеса типа 8	Саркома Капоши, лимфома	
	Вирус папилломы человека	Цервикальная или аноректальная дисплазия	
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Пневмония	
<200	<i>Pneumocystis carinii</i>	Пневмония, диссеминированная инфекция	
	<i>Toxoplasma gondii</i>	Энцефалит, хориоидит	
	<i>Cryptosporidia/microsporidia</i>	Гастроэнтерит, диарея	
	<i>Iso spora</i>	Диарея	
	<i>Encapsulated bacteria</i>	Пневмония, синусит	
	<i>Shigella, Salmonella, Campylobacter</i>	Дизентерия, бактериемия	
	<i>Treponema pallidum</i>	Вторичный нейросифилис	
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Пневмония, диссеминированное заболевание	
	<100	Вирус <i>Herpes simplex</i>	Эзофагит
		Вирус <i>Herpes zoster</i>	Кожная диссеминация
Цитомегаловирус		Ретинит, колит, нейропатия	
<i>Candida spp.</i>		Эзофагит	
<i>Cryptococcus neoformans</i>		Менингит, пневмония, диссеминация	
<i>Histoplasma capsulatum</i>		Диссеминированное заболевание	
<i>Penicillium marneffeii</i>			
<i>Mycobacterium avium-intracellulare</i>			

Таблица 2. Классификация СПИДа

Уровень CD4+ Т-клеток в 1 мкл крови	Клиническая категория		
	А – бессимптомная острая (первичная) ВИЧ-инфекция или ПГЛ	В – манифестная, но не А и не С	С – СПИД-индикаторные состояния
>500	A1	B1	C1
200–400	A2	B2	C2
<200	A3	B3	C3

Примечание: ПГЛ – периферическая генерализованная лимфоаденопатия.

данному исследованию выдает региональный центр СПИДа.

Обнаружение ВИЧ методом полимеразной цепной реакции (качественно)

Обнаружение ВИЧ методом полимеразной цепной реакции – ПЦР (качественно) проводится с целью:

- разрешения сомнительных результатов иммуноблоттингового исследования;

- для ранней диагностики инфицирования ВИЧ;
- контроля эффективности противовирусного лечения;
- определения стадии заболевания СПИДом (переход инфицированности в заболевание).

При первичном инфицировании ВИЧ метод ПЦР позволяет выявить РНК ВИЧ в крови уже спустя 10–14 суток после инфицирования.



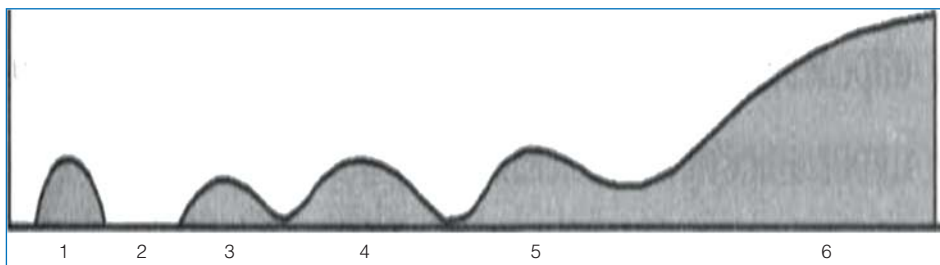


Рис. 1. Фазы ВИЧ-инфекции: 1 – фаза первичных проявлений; 2 – бессимптомная фаза; 3 – персистирующий генерализованный лимфаденит; 4 – стадия вторичных заболеваний; 5 – СПИД; 6 – виремия

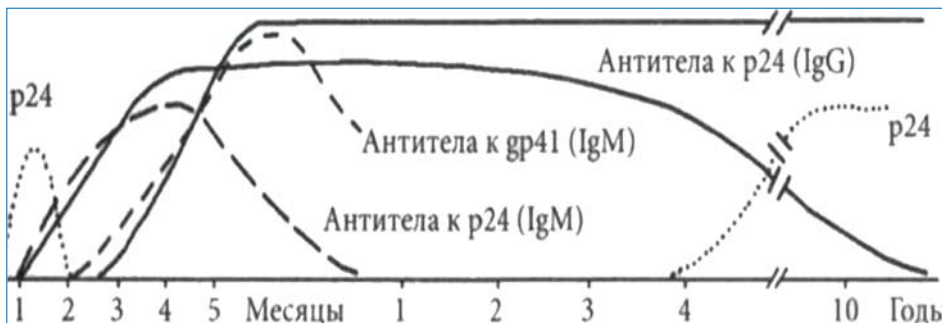


Рис. 2. Появление классов антител на различных стадиях ВИЧ-инфекции

Результат исследования выражается качественно: положительный или отрицательный. Отрицательный результат исследования указывает на отсутствие РНК ВИЧ в крови. Положительный результат – выявление РНК ВИЧ – свидетельствует об инфицировании пациента.

Обнаружение ВИЧ методом полимеразной цепной реакции (количественно)

ВИЧ в крови в норме отсутствует.

Прямое количественное определение РНК ВИЧ с помощью ПЦР позволяет более точно, чем определение содержания клеток CD4, предсказать скорость развития СПИДа у лиц, инфицированных ВИЧ, следовательно – более точно оценить их выживаемость. Высокое содержание вирусных частиц обычно коррелирует с выраженным нарушением иммунного статуса и низким содержанием клеток CD4. Низкое содержание вирусных частиц обычно коррелирует с более благополучным иммунным статусом и более высоким содержанием клеток CD4. Содержание вирусной РНК в крови позволяет предсказать переход заболевания в клиническую стадию. При содержании РНК-1 ВИЧ >74 100 копий/мл почти у всех пациентов развивается клиническая картина СПИДа (Senior D., Holden E., 1996). Вероятность развития СПИДа в 10,8 раз выше у лиц с содержанием ВИЧ-1 в крови >10 000 копий/мл, чем у лиц с содержанием ВИЧ-1

в крови <10 000 копий/мл. При ВИЧ-инфекции прогноз непосредственно определяется уровнем виремии. Снижение уровня виремии при лечении улучшает прогноз заболевания.

Группой экспертов США разработаны показания для терапии пациентов с ВИЧ. Лечение показано пациентам с количеством клеток CD4 в крови <300/мкл или уровнем РНК ВИЧ в сыворотке >20 000 копий/мл (ПЦР). Оценка результатов антиретровирусной терапии у лиц, инфицированных ВИЧ, проводится по снижению уровня сывороточной РНК ВИЧ. При эффективном лечении уровень виремии должен снижаться в 10 раз в течение первых 8 недель и быть ниже предела чувствительности метода (ПЦР) (<500 копий/мл) через 4–6 месяцев после начала терапии.

Таким образом, на сегодняшний день в клиническую практику для диагностики ВИЧ-инфекции внедрены и используются множество методов исследования, как и для всех других вирусных инфекций. Среди них ведущая роль отводится серологическим исследованиям. Основные методы диагностики ВИЧ-инфекций представлены в таблице 3, где они разделены в зависимости от важности каждого метода для выявления вирусов на четыре уровня:

- А – тест обычно используется для подтверждения диагноза;
- В – тест полезен в определенных обстоятельствах для диагностики отдельных форм инфекции;

- С – тест редко используется для целей диагностики, но имеет большое значение для эпидемиологических обследований;
- D – тест обычно не используется лабораториями в диагностических целях.

Поскольку для диагностики вирусных инфекций помимо выбора оптимального метода анализа не менее важно правильное определение и взятие биоматериала для исследования, в таблице 4 приведены рекомендации по выбору оптимального биоматериала для исследования ВИЧ-инфекции.

Для мониторинга ВИЧ-инфицированных следует использовать возможности комплексного исследования иммунного статуса – количественное и функциональное определение всех его звеньев: гуморального, клеточного иммунитета и неспецифической резистентности в целом.

В современных лабораторных условиях многоэтапный принцип оценки иммунологического статуса включает определение субпопуляции лимфоцитов, иммуноглобулинов крови. При оценке показателей следует учитывать, что для ВИЧ-инфекции характерно снижение соотношения CD4/CD8 Т-клеток меньше 1. Индекс CD4/CD8 1,5–2,5 – указывает на нормергическое состояние, более 2,5 – указывает на гиперактивность, менее 1,0 – свидетельствует об иммунодефиците. Также соотношение CD4/CD8 может быть меньше 1 при тяжелом течении воспалительного процесса. Принципиальное значение это соотношение имеет при оценке иммунной системы у больных СПИДом, потому что ВИЧ избирательно поражает и разрушает CD4-лимфоциты, в результате чего соотношение CD4/CD8 понижается до значений, значительно меньше 1.

Оценка иммунологического статуса опирается также на выявление общих или «грубых» дефектов в системе клеточного и гуморального звена иммунитета: гипергаммаглобулинемия (повышение концентрации IgA, IgM, IgG) или гипогаммаглобулинемия в терминальной стадии; увеличение концентрации циркулирующих иммунных комплексов; снижение продукции цитокинов; ослабление ответа лимфоцитов на антигены и митогены.

Нарушение соотношения популяций в общем пуле В-лимфоцитов характерно для недостаточности гуморального иммунитета. Однако эти изменения неспецифичны для ВИЧ-инфекции и могут возникать при других заболеваниях. В комплексной оценке ряда других лабораторных показателей следует учитывать, что для ВИЧ-инфекции характерны также: анемия, лимфо- и лейкопения, тромбоцитопения, повышение уровня β₂-микроглобулина и С-реактивного протеина, повышение активности трансаминаз в сыворотке крови.

