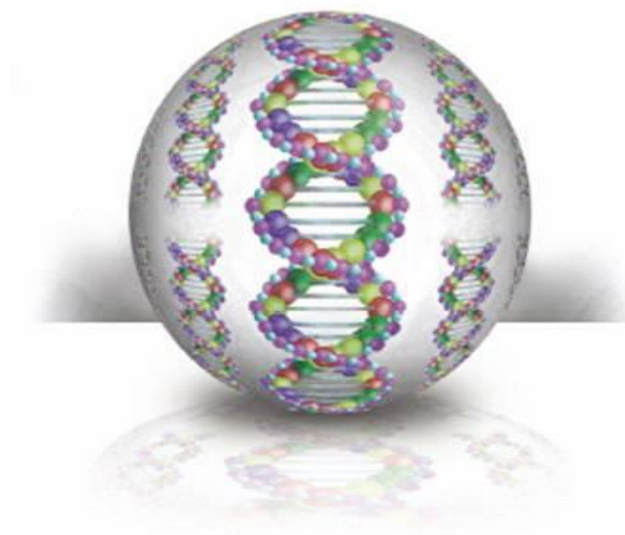


Лабораторная диагностика при ВИЧ-инфекции



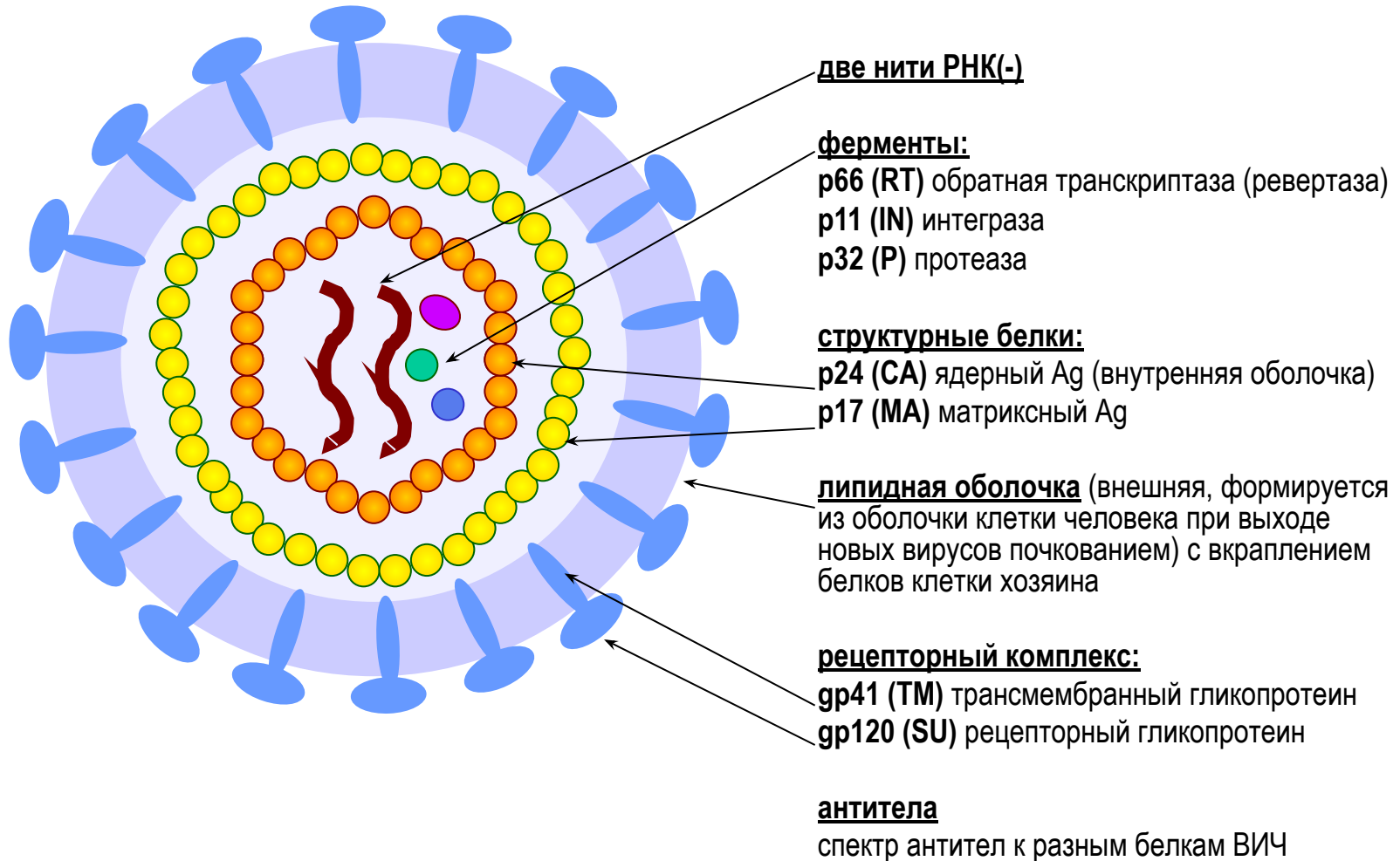


- презентация составлена на кафедре детских инфекционных болезней Государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования» (БелМАПО), Минск, Беларусь (зав. кафедрой профессор А.А. Ключарева)
- презентация используется при обучении слушателей на курсах повышения квалификации «Лечение и профилактика ВИЧ-инфекции»
- составитель ассистент Н.В. Голобородько (э-адрес: m_hol@tut.by)
- при составлении презентации использованы материалы:
- скачано с сайта БелМАПО: <http://www.belmapo.by/page/3/40/>, дата создания презентации – 2005 г., дата последнего обновления: 30 мая 2007 г.
- данная презентация является только учебным материалом и не может служить справочником по ведению пациентов с ВИЧ-инфекцией; в презентации возможны неточности; авторы не несут ответственности за возможные негативные последствия использования материалов презентации
- использование и тиражирование данной презентации приветствуется; при использовании хорошим тоном считается ссылка как на нас, так и на авторов процитированных нами материалов

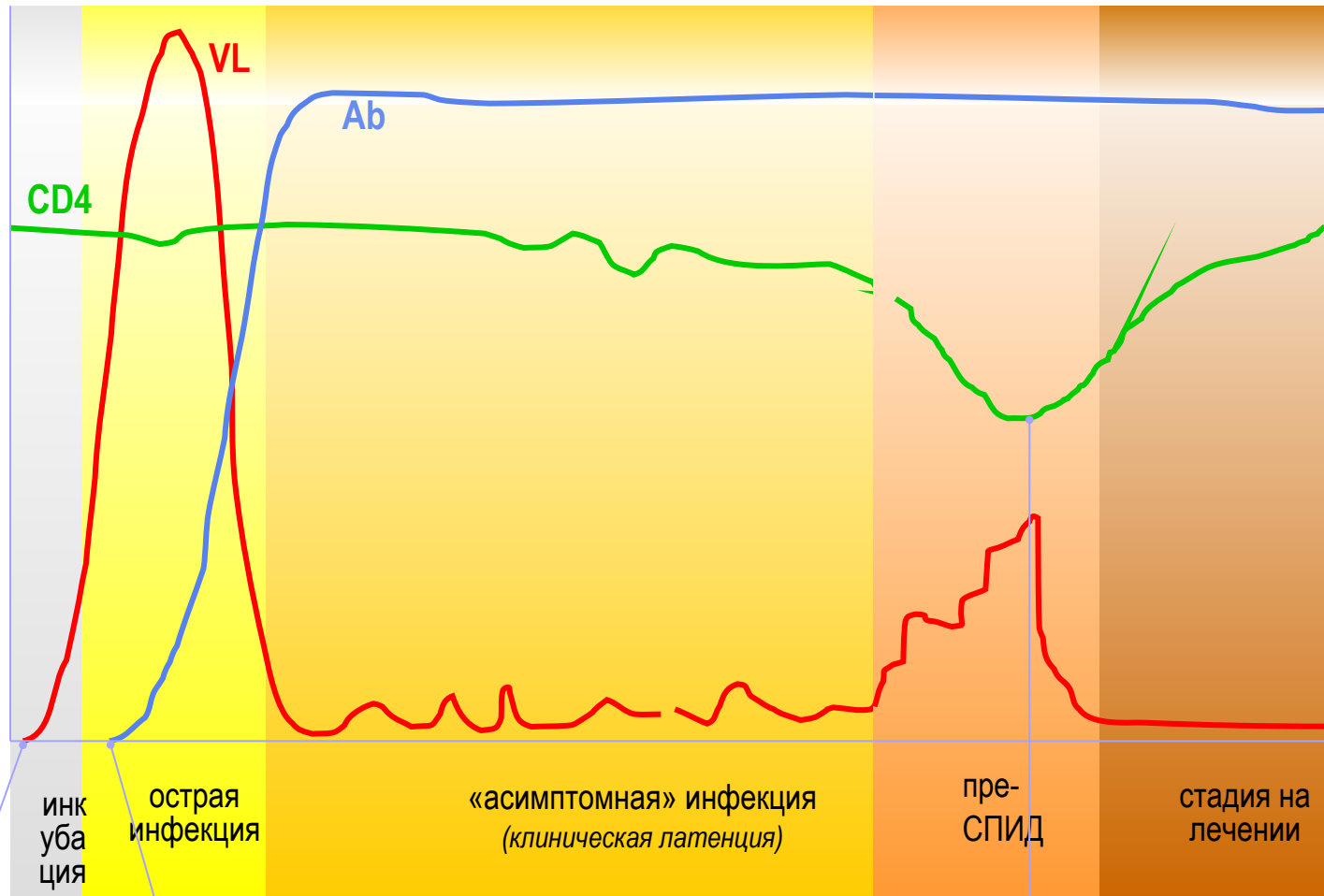
Задачи лабораторной диагностики ВИЧ

- 1. Определить ВИЧ-статус (да/нет)**
- 2. Исследования у ВИЧ-позитивного пациента:**
 - определить стадию ВИЧ-инфекции и прогноз течения,
 - сформулировать показания к терапии,
 - проводить контроль эффективности терапии

Строение ВИЧ: что же мы определяем лабораторно?



Естественное течение ВИЧ-инфекции: клинико-лабораторные параллели



появление вiremии
(1-5 сутки от заражения половым путем)

появление антител
(«серологическое окно»,
~3-6 недель, до 6 мес)

стадия
пре-СПИД
стадия АРТ

Как скоро после инфицирования ВИЧ сработают различные тесты?

Скрининг тесты

Антитела к ВИЧ

Антитела к ВИЧ/антигены ВИЧ (комбинир. тесты)

Подтверждающие (дополнительные) тесты

Антитела к ВИЧ (подтверждающий тест)

Антиген ВИЧ

РНК ВИЧ

- = как правило, негативный
- = возрастание частоты позитивных
- = как правило, позитивный
- = снижение частоты позитивных

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
неделя после инфицирования ВИЧ

Тесты для лабораторной диагностики при ВИЧ-инфекции

1. Тесты для диагностики:

- Скрининговые для определения антител: иммуноферментный анализ (ИФА), в т.ч. быстрые тесты
- Подтверждающие для определения антител : иммунный блотинг (ИБ);
- Методы амплификации НК: качественная ПЦР(ДНК-ПЦР) в культуре лимфоцитов крови

2. Тесты для слежения за течением:

- Методы амплификации НК: количественная ПЦР (РНК-ПЦР, вирусная нагрузка) в плазме
- Определение иммунного статуса: CD4

Кто подлежит обследованию на ВИЧ?

е
с
т
и
р
о
в
а
н
и
е

добровольное исключение

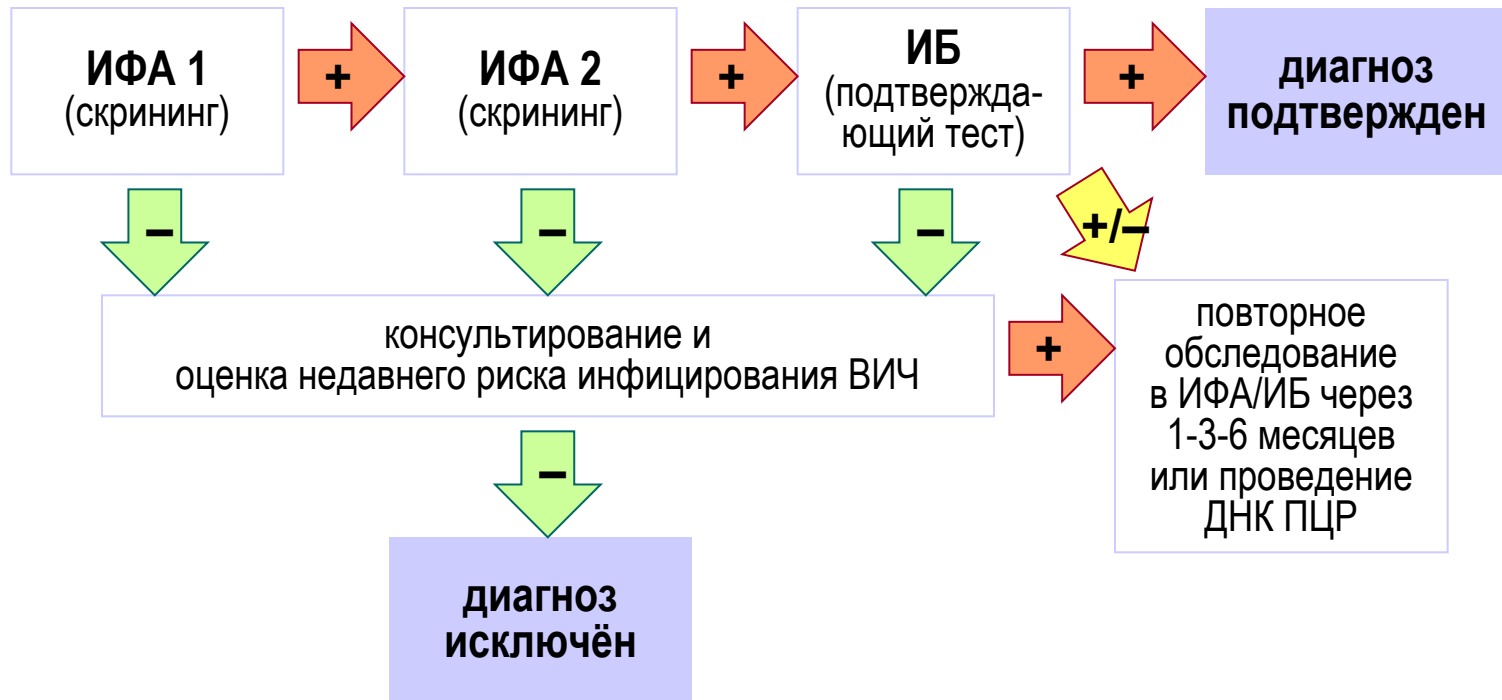
*предложение от врача
с возможностью отказаться*

добровольное включение

*по желанию (запросу)
самого пациента*

- доноры
- иностранцы
- из очагов: бывшие в половом контакте с ВИЧ+ лицом или в сходных условиях по риску заражения ВИЧ
- по клиническим показаниям (при наличии оппортунистических инфекций или ряда возможных признаков иммунодефицита) – как пациенты, так и аутопсийный материал
- получающие частые гемотрансфузии
- плацентарная кровь, поступающая на переработку
- дети от ВИЧ+ матерей или оформляющиеся в госучреждения
- пациенты с ИППП
- ПИН, МСМ, ЖСБ
- поступившие в следственный изолятор или приемник-распределитель
- медработники в случае профессионального контакта
- все изъявившие пройти обследование, в том числе анонимно

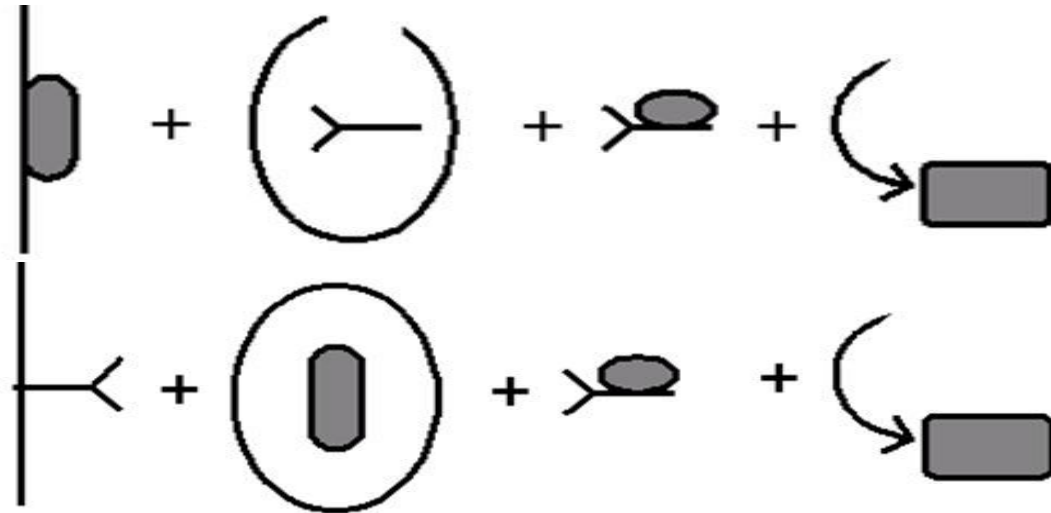
Диагностический алгоритм обследования на ВИЧ-инфекцию



Биологические жидкости, в которых можно определять антитела к ВИЧ

- Сыворотка крови, полученная путем центрифугирования цельной крови
- Цельная капиллярная кровь (взятая из пальца)
- Транссудат слизистой полости рта, собранный с помощью специального приспособления (тесты «Oral Fluid», «OMT-EIA»)
- Моча

ИФА: принцип метода



Ag/Ab
сорбированные
на твердой фазе
(ПХВ планшеты
на 96 лунок)

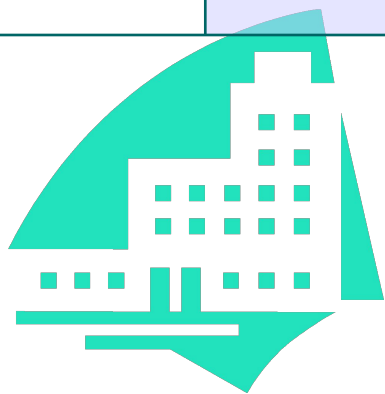
определяемые
Ab/Ag
(исследуемая
сыворотка)

конъюгат
фермента
и Ab

расщепление
хромогена с
образованием
окрашенного
комплекса

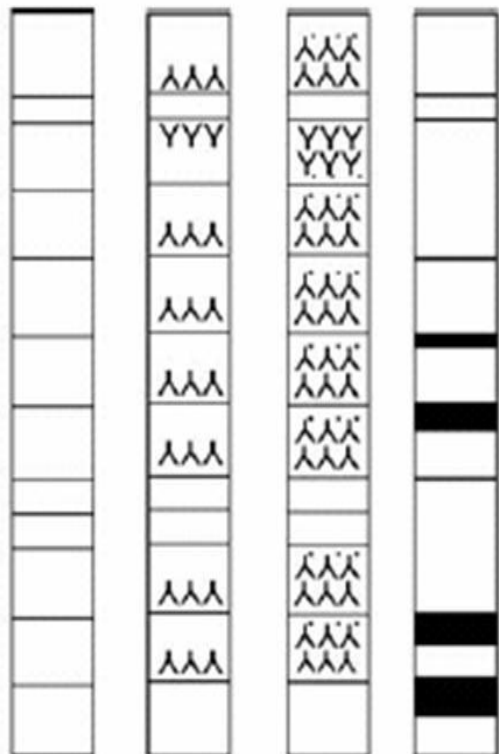
Поколения тестов для ИФА

| | <i>определение Ab</i> | <i>определение Ag</i> |
|-----------|--|---|
| первое | основаны на нативном вирусе | нет |
| второе | основаны на рекомбинантных белках или синтетических пептидах | нет |
| третье | в качестве конъюгата меченные белки ВИЧ | нет |
| четвертое | в качестве конъюгата меченные белки ВИЧ | определяют p24 антиген – то есть работают в период «серологического окна» и используются для тестирования донорской крови |

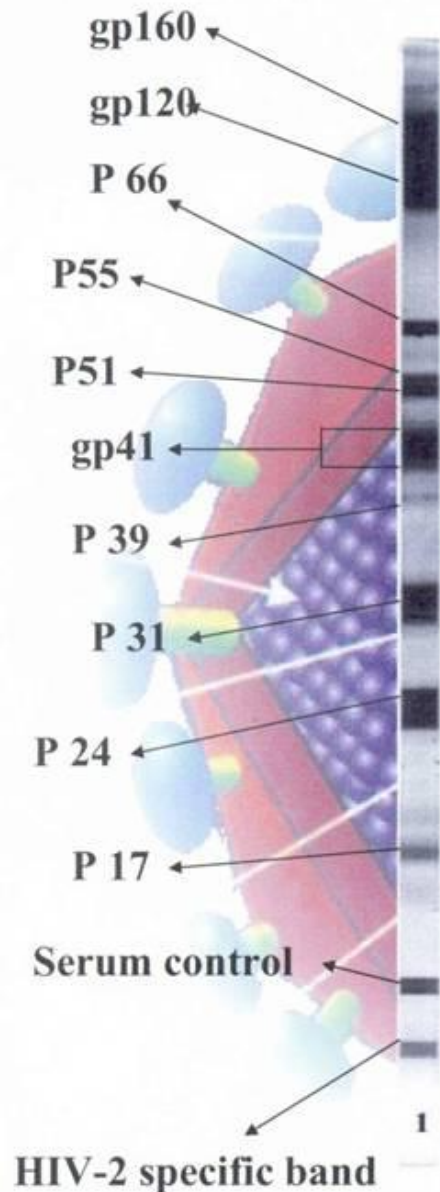


* p24 Ag есть в период окна, а затем появляются и обнаруживаются только anti-p24 – то есть ИФА 4поколения помогает в донорстве и у детей с перинатальным контактом, но он не заменяет ИБ как подтверждающий тест

ИБ (western blot): принцип метода



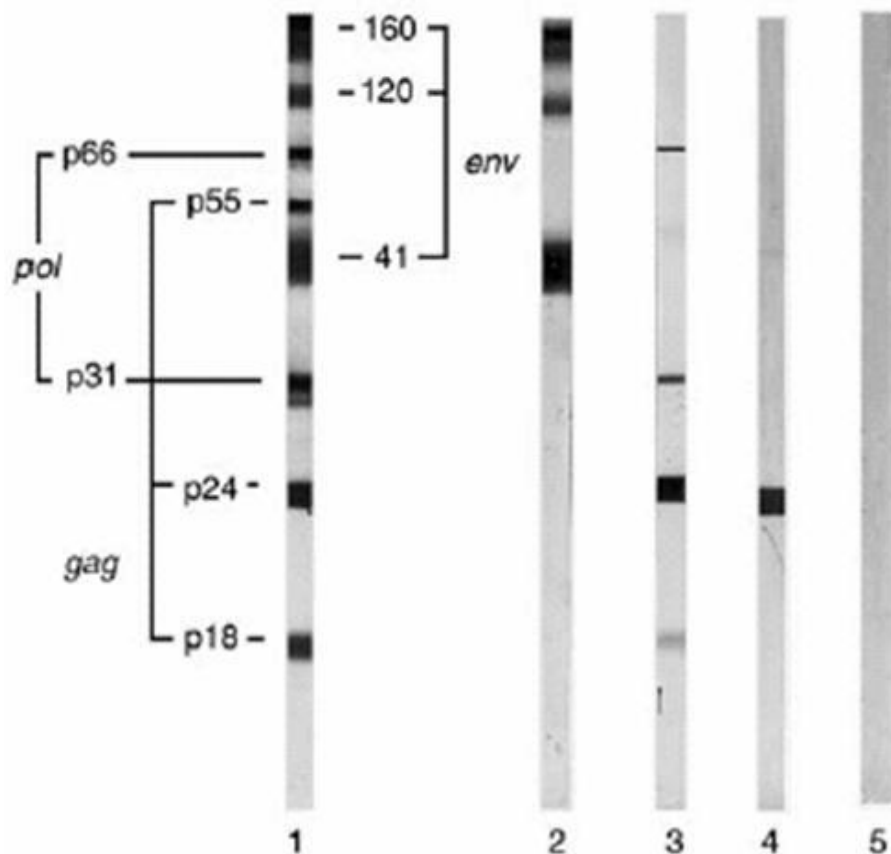
1. ЭФ разделение белков ВИЧ-1 (стандартный реагент) по их молекулярной массе
2. Инкубация с добавлением исследуемой сыворотки – **специфическое соединение белков ВИЧ с соответствующими отдельными антителами к ВИЧ из добавленной сыворотки**
3. Инкубация с добавлением меченных ферментом антител к человеческим Ig
4. Детекция окрашенных полос



ИБ: трактовка результатов

Критерии положительного ИБ:

- CDC/APHL: сочетание 2 полос, соответствующих любым 2 из 3 антигенов ВИЧ – p24, gp41, gp120/gp160 (максимально чувствительный вариант)
- ВОЗ: сочетание 2 полос, соответствующих gp41 и gp120/gp160



1. Положительный ИБ к ВИЧ-1
2. Отрицательный ИБ (у здорового человека, иммунизированного белками внешней оболочки ВИЧ-1)
3. Сомнительный ИБ (у инфицированного ВИЧ-2)
4. Сомнительный ИБ (наличие антител, перекрестно реагирующих с p24 Ag)
5. Отрицательный ИБ

Э. Фаучи, К. Лэйн, Глава 308 ВИЧ-инфекция

Быстрые тесты

- выявляют IgM Ab – то есть даже более чувствительны, чем ИФА 1-3 поколений
- для экстренного уточнения ВИЧ-статуса в медучреждениях (обследование беременных, поступивших рожать с неизвестным ВИЧ-статусом, и обследование биоматериала при профессиональных контактах) – методикой постановки должен владеть любой акушер дежурной бригады и врач приемного покоя
- для домашнего использования

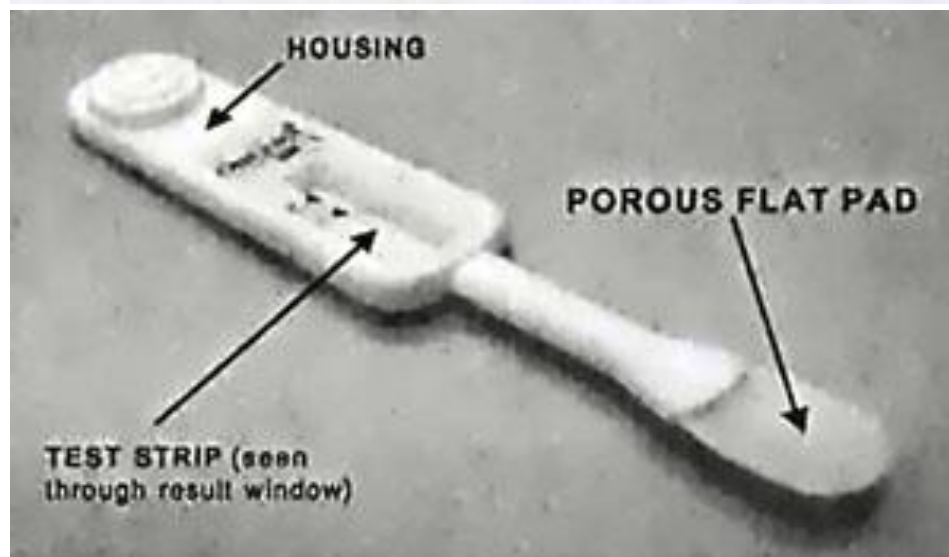
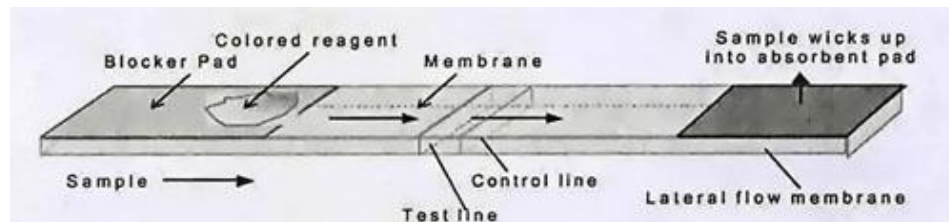
OraQuick® тестполоска

каплю цельной капиллярной крови берут из пальца специальной петлей, переносят во флакон с буфером и перемешивают,

там осуществляется реакция, и в окошке считывают результат

чувствительность 99,6%,
специфичность ~100%,
время постановки 20 минут

«-» тест = здоров,
«+» тест => в ИФА и ИБ



Снижение порога доступа к тестированию на ВИЧ

проблема: приблизить сервис к потребителю; решения:

| | | |
|--|--------------------------|---|
| Возможность анонимного обследования практически в каждом медучреждении | Беларусь | «-»: пациенты групп риска (например, ПИН) не всегда мотивированы сдавать кровь в поликлинике |
| Возможность сдать кровь на ПОШ | СПб, Россия | «-»: за получением результата обращаются не более двух третей сдавших кровь |
| Возможность купить в аптеке быстрый тест | некоторые страны ЕС, США | «-»: отсутствие консультирования, пациент может напутать даже в простой методике, риск ложных результатов |
| Возможность взять кровь дома самостоятельно и отослать на анализ в лабораторию | некоторые страны ЕС, США | «-»: отсутствие консультирования, пациент может напутать даже в простой методике |

проблема: обеспечение качества предоставления услуги; решения:

- лабораторный контроль качества (подтверждающий ИБ при «+» быстром тесте, правильная доставка крови в лабораторию)
- внедрение «горячих линий» для консультирования

Самостоятельный забор материала пациентом и отсылка его в лабораторию

Put this between your cheek and gum for 2 minutes.

Believe it or not, you've just taken an accurate new test for HIV.

Introducing OraSure, the first noninvasive HIV testing system.

- The OraSure HIV-1 oral specimen collection device is designed to draw antibodies — not virus — from the tissue of the cheek and gum.
- 99.97% of 3570 people in clinical trials received the correct result or appropriate follow-up.
- Safer than blood.
- Easy to use — for patients and for you.

| Results in Known HIV Negative People | | | | |
|--------------------------------------|-------------|-------------|------------------|-------------|
| EA Report Results (17) | | | | |
| Number Tested | EA Negative | WB Negative | WB Indeterminate | WB Positive |
| 2097 | 2080 | 13 | 4 | 0 |

| Results in Known HIV Positive People | | | | |
|--------------------------------------|-------------|-------------|------------------|-------------|
| EA Report Results (177) | | | | |
| Number Tested | EA Negative | WB Negative | WB Indeterminate | WB Positive |
| 173 | 1 | 0 | 2 | 165 |

OraSure

Home Access Code Number
452-542-035-43

All printed instructions must be carefully followed step-by-step.

You must activate your Home Access Code Number by calling
1-800-400-8981

3
Blood Specimen Collection Card

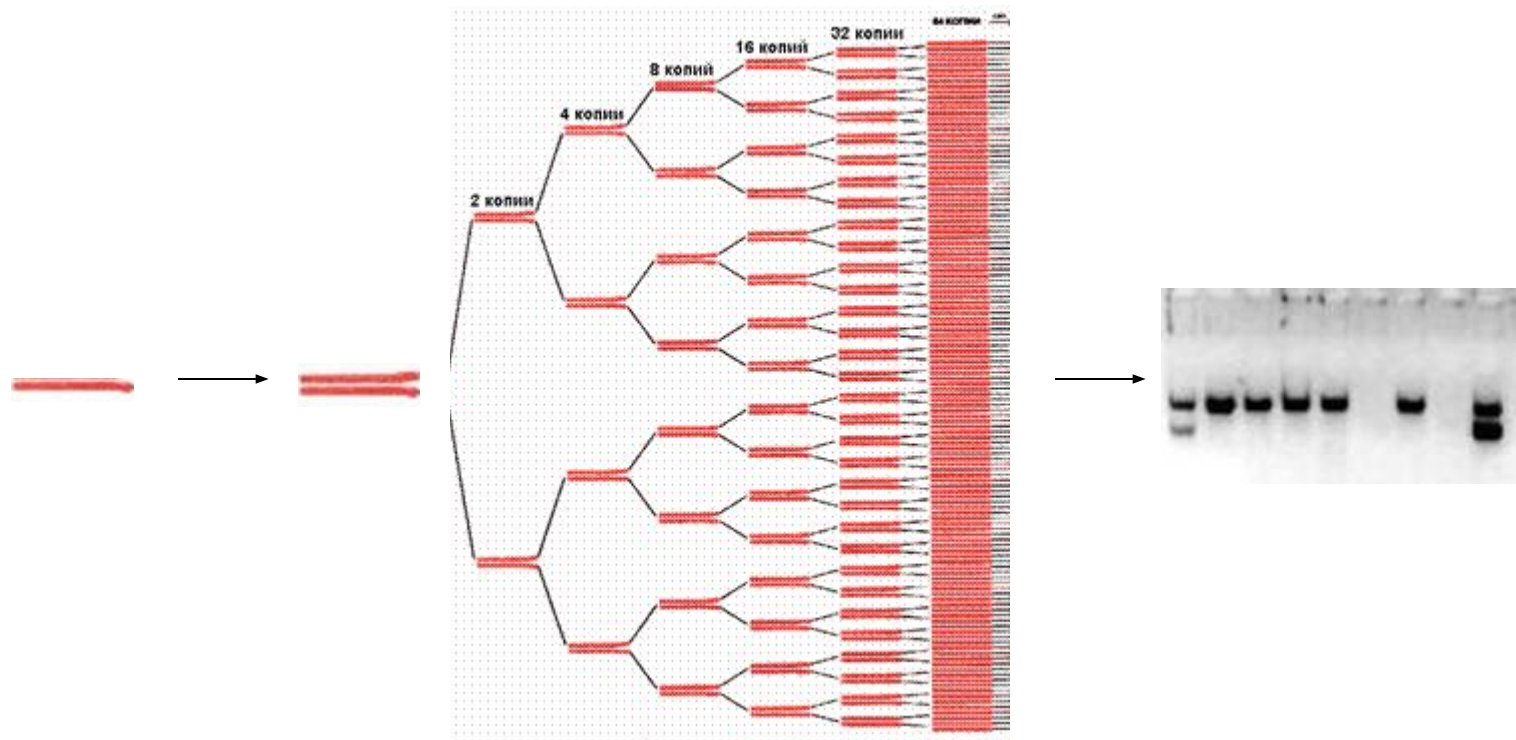
I have read and understand the informed consent found in the Directional Insert (1) and I am authorizing Home Access Health Corporation to test the attached blood spot sample for antibodies to HIV-1.

Home Access Health Corporation
1996 Copyright Home Access Health Corporation
Healthway Edition, © 2010

- **определение антител в транссудате слизистых полости рта (не в слюне)**
- подержать между щекой и десной несколько минут, отослать в лабораторию и через 2 недели получить результат
- в лаборатории: ИФА + ИБ
- 99.97% из 3570 обследованных имели корректный результат

- **определение антител в крови**
- скарификатором проколоть палец и капнуть каплю крови на бумагу
- запомнить персональный номер данного теста и телефон, запечатать и отослать бумагу в лабораторию (заполненный конверт прилагается) и по телефону узнать результат теста
- в лаборатории: ИФА + ИБ

ПЦР: принцип метода



выделение
РНК/ ДНК
ВИЧ

обратная
транскрипция
РНК в кДНК

амплификация
выделенного
ДНК

детекция продукта
амплификации
(ЭФ, ГИФА,
фотометрия при
real-time ПЦР)

Качественная и количественная ПЦР

| | что определяет | материал для исследования | клиническое использование |
|--|---|----------------------------------|--|
| качественная  | ДНК-ПЦР: наличие ДНК ВИЧ, интегрированного в геном клетки-мишени (лимфоцита) – резервуара инфекции | культура лимфоцитов крови | определение ВИЧ-статуса: - ВИЧ-экспонированные дети (есть антитела, но неясно чьи они); - в период серологического окна – после профессиональных контактов и при наличии клиники острого ретровирусного синдрома (когда у инфицированных ВИЧ антитела еще отсутствуют или субопределяемы) |
| количественная (VL, вирусная нагрузка)  | РНК-ПЦР: наличие РНК свободных вирионов ВИЧ, находящихся в плазме | плазма крови | прогнозирование течения ВИЧ-инфекции у пациентов без терапии; контроль эффективности АРТ (стартовая VL и в динамике); выбор тактики родоразрешения у ВИЧ+ беременных |

Условная градация уровней VL

| градация уровней | VL, копий/мл | |
|---|---|--------------------|
| | методом RT-PCR | методом bDNA |
| порог определения | < 1 500 | < 500 |
| очень низкий | 1 500 - 7 000 | 500 - 3 000 |
| низкий | 7 000 - 20 000 | 3000 - 10 000 |
| умеренный | 20 000 - 55 000 | 10 000 - 30 000 |
| порог возможного старта прогрессирования ВИЧ-инфекции, требующий дополнительной оценки клинического статуса и уровня CD4-клеток для решения вопроса о начале АРТ | > 55 000 (для детей > 100 000) | > 30 000 |
| высокая | > 80 000 - 100 000 | > 80 000 - 100 000 |

Трактовка значений VL

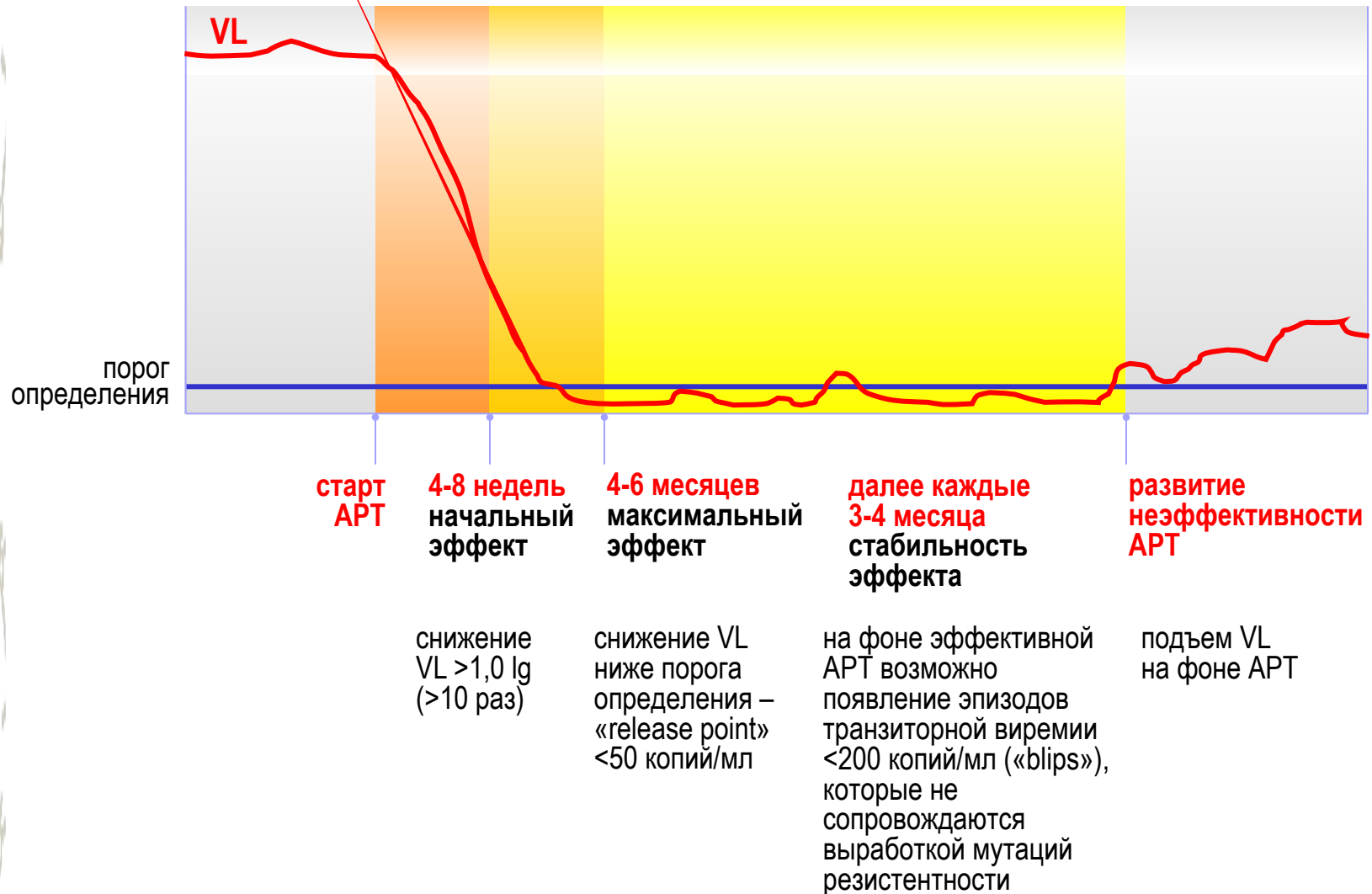
Ограничения в трактовке:

- возможны естественные колебания VL в условиях полного благополучия
- транзиторное повышение уровня VL могут вызвать появление острого эпизода оппортунистической инфекции или вакцинация
- VL не является стандартным тестом для диагностики ВИЧ-инфекции

Что делать?

- значимыми колебаниями VL следует считать более 3 раз (например, повышение с 20 тысяч до более чем 60 тысяч копий/мл); при сомнениях, выросла ли VL или осталась на прежнем уровне, следует повторить анализ
- забор крови на VL следует проводить не ранее чем через 2-4 недели после исчезновения симптомов острой инфекции (если невозможно – то все заборы проводить в примерно схожем клиническом состоянии пациента) или вакцинации
- результаты определения VL должны заново перепроверяться перед стартом или изменением АРВ терапии
- диагноз ВИЧ-инфекции, выставленный при обнаружении РНК ВИЧ в крови, должен быть подтвержден стандартными тестами – постановкой качественной ПЦР (определение ДНК ВИЧ) или постановкой ИБ (с повтором ИБ спустя 2-4 месяца после начального сомнительного или отрицательного теста)

VL на фоне АРТ: контроль эффективности лечения



Лабораторное обследование детей, рожденных ВИЧ+ матерями

| возраст | частота выявления ДНК ПЦР у вертикально инфицированных ВИЧ детей | частота выявления материнских anti-HIV у неинфицированных детей |
|-----------------|---|--|
| первые 48 часов | 17-38% | |
| 10-14 дней | 50-93% | |
| 1-2 мес | 92-98% (1-е обязат. обслед-е) | |
| 4-6 мес | (2-е обязат. обслед-е) | |
| 9 мес | | |
| 12 мес | | |
| 15 мес | | |
| 18 мес | | ≈0 |

целесообразность проведения подтверждающего ИБ для определения (материнских) Ab у экспонированных?

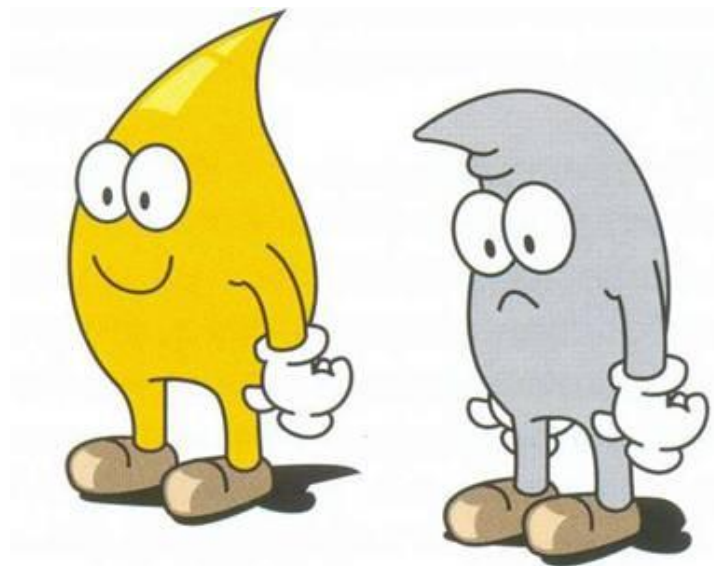
- исключение диагноза ВИЧ-инфекции ≠ снятие с дисп. учета
(≥ 2 отр. ДНК ПЦР) (≥ 2 отр. ИФА)

Особенности VL у детей

- в целом дети имеют более высокие уровни VL, высокой считается VL > 100 тысяч копий/мл
- VL при перинатальной ВИЧ-инфекции: при рождении обычно низкая (< 10 тысяч копий/мл), ко 2 месяцу жизни достигает высоких значений (> 100 тысяч копий/мл), а затем в течение нескольких лет медленно снижается (в течение первых 2 лет в среднем на 0,6 lg в год, в течение следующих 4-5 лет в среднем на 0,3 lg в год)
- начальный эффект на АРТ оценивается как достигнутый при снижении VL более чем на 0,7 lg у детей до 2 лет и более чем на 0,5 lg у детей старше 2 лет

Цитофлюориметрическое определение количества CD4-клеток

- в проточном цитометре клетки крови разделяются по их размеру (объему)
- добавленные меченные красителем моноклоновые антитела, соединяясь с комплементарными им CD4 рецепторами лимфоцитов/ моноцитов, вызывают изменение окраски рабочего раствора, что определяется фотометрически



Зачем нужно определение CD4?

- **установление стадии (иммунологической категории) ВИЧ-инфекции**
- **установление показаний для начала и отмены профилактического лечения оппортунистов**
- **установление показаний для начала АРТ**
- **слежение за иммунологическим ответом на АРТ (восстановление CD4 при лечении)**

| иммунологическая категория | CD4, % от лимфоцитов | | CD4, клеток/мкл | | |
|-------------------------------------|----------------------|----------------|-----------------|----------|--------------------|
| | ≤ 12 месяцев | > 13 месяцев | ≤ 1 года | 1-5 лет | ≥ 6 лет и взрослые |
| отсутствие значимой ИС | ≥ 30 | ≥ 25 | ≥ 1500 | ≥ 1000 | ≥ 500 |
| легкая ИС | 25-29 | 20-24 | 1000-1500 | 750-1000 | 350-500 |
| умеренная («продвинутая») ИС | 20-24 | 15-19 | 750-1000 | 500-750 | 200-350 |
| выраженная ИС | < 20 | < 15 | < 750 | < 500 | < 200 |

Субпопуляции Т-лимфоцитов у детей: диапазоны нормальных значений

| | 5 дней –3 мес | 4-8 мес | 1-2 года | 2-5 лет | >5 лет |
|------------------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|
| лимфоциты, % | 55-78 | 45-79 | 44-72 | 38-64 | - |
| , x 10 ⁹ /л | 2,9-8,8 | 3,6-8,8 | 2,1-8,3 | 2,4-5,9 | 1,1-5,9 |
| CD 3 , % | 60-87 | 57-84 | 53-81 | 62-80 | 66-76 |
| , x 10 ⁹ /л | 2,0-6,5 | 2,2-6,5 | 1,4-5,4 | 1,6-4,2 | 0,7-4,2 |
| CD 4 , % | 41-64 | 36-61 | 31-54 | 35-51 | 33-41 |
| , x 10 ⁹ /л | 1,4-5,1 | 1,6-4,6 | 1,02-3,6 | 0,9-2,9 | 0,3-2,0 |
| CD 8 , % | 16-35 | 16-34 | 16-38 | 22-38 | 27-35 |
| , x 10 ⁹ /л | 0,6-2,4 | 0,7-2,5 | 0,5-2,2 | 0,6-1,9 | 0,3-1,8 |
| В , % | 12-22 | | | | |
| , x 10 ⁹ /л | 0,2-1,6 | | | | |
| CD 16 , % | 9-16 | | | | |
| , x 10 ⁹ /л | 0,09-0,9 | | | | |

Трактовка значений CD4

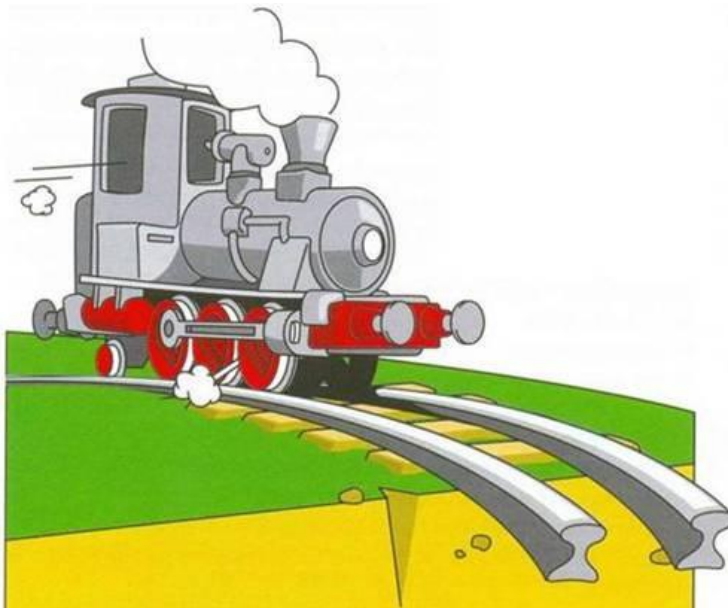
Ограничения в трактовке:

- весьма широкий диапазон нормальных значений CD4
- на уровень CD4 влияет масса факторов: время суток при заборе, наличие острых заболеваний или вакцинации, вызывающих лейкопению лекарств (например, прием ИНФ-а для лечения ко-инфекции ВГ), стресс, курение, фазы менструального цикла и пр.
- CD4 в сыворотке не равно CD4 в организме (исследуемый нами сывороточный пул составляет не более 20% всех CD4)
- нет учета функциональной активности CD4
- лимфоцитарные перекресты у детей затрудняют трактовку абсолютных значений CD4

Что делать?

- забор крови следует проводить в одно и то же время суток, не ранее чем через 1 неделю после исчезновения симптомов острой инфекции (если невозможно – то все заборы проводить в примерно схожем клиническом состоянии пациента) и не ранее чем через 1 неделю после вакцинации
- не делать заключений на основании единственного результата, а проводить повторное определение CD4 (через 1-3-6 месяцев в зависимости от состояния пациента) с клинической интерпретацией при получении сходных результатов
- у детей первых 6 лет ориентироваться на % содержание CD4, а не на абсолютные значения

Лабораторные данные в формулировке показаний к АРТ



CD4 (иммунный статус) –
это «расстояние, оставшееся до пропасти» = констатация стадии

VL (вирусная нагрузка) –
это скорость, с которой движется поезд = прогноз

| | | |
|--------------------------|--|---|
| клиника СПИДа | констатация имеющейся иммуносупрессии | основное показание к АРТ |
| уровень CD4 | | ориентируемся при отсутствии клиники (не всегда существует корреляция клиники и CD4 ! – часто возможно в т.ч. появление клинической симптоматики при нормальных/ некритично сниженных CD4 и наоборот) |
| вирусная нагрузка | прогноз | при высокой VL вероятно в ближайшем будущем снизятся CD4 и появится клиника |

Забор и транспортировка материала

| <i>исследование</i> | <i>V крови</i> | <i>антикоагулянт</i> | <i>подготовка пробы</i> | <i>транспортировка</i> |
|--|----------------|--------------------------------------|---|--|
| Количество CD4 лимфоцитов | 3-5 мл | ЭДТА | перемешать (недопущение образования сгустка, но не разрушать клетки!) и закрыть | до 4 часов (разрушение клеток! дольше - ???) при комнатной t° (не в холодильнике!) |
| Качественное определение ВИЧ | 1-2 мл | ЭДТА (не гепарин!, не цитрат!) | перемешать (недопущение образования сгустка, но не разрушать клетки!) и закрыть | до 4 суток при +2+8°C (не замораживать!) |
| Вирусная нагрузка/ Лекарственная резистентность | 2-3 мл | ЭДТА (не гепарин!, не цитрат!) | перемешать и закрыть выделение плазмы – центрифугирование 80-100 об/мин 20 мин | до 6 ч при +2+8°C (РНКазы!) до 1 суток при +2+8°C, заморозка: -20°C – 1 месяц -80°C – 6 месяцев |

Забор крови на CD4 и VL в процедурном кабинете ОЦП СПИД

| | | | |
|---|----------------------|---------------------|--|
| процедурный кабинет (забор крови) | | 2277911 | Ульяновская 3 (район стадиона Динамо), забор крови: Вт, Чт 9.00-13.00 Врачу перед направлением пациента следует предварительно созваниваться с процедурным кабинетом – уточнять о наличии тест-систем и изменениях в графике работы Пациенту с собой иметь заполненное направление от врача |
| лаборатория (консультации по поводу тестов) | CD4, ВН и ДНК ВИЧ | 2075464, 2075565 | любой из врачей-лаборантов |
| | резистентность | | |



доказательные
медицинские
рекомендации

тесный контакт
клинициста
и лаборанта

здравый смысл
и клиническое
мышление



правильное
клиническое
решение

«врачебные»
и «лабораторные»
ошибки
диагностики

засилие рекламы
методов диагностики
от производителей
и финансируемых
ими «ученых»



Ключевые позиции для усвоения

- Диагноз ВИЧ-инфекции может быть установлен при серологическом обследовании (рутинное тестирование: два ИФА «+» и подтверждающий тест ИБ «+») или при проведении качественной ПЦР двукратно (обычно тестирование детей, рожденных матерями с ВИЧ, и при профессиональных контактах)
- При тестировании донорской крови период «серологического окна» можно значительно сократить, применяя ИФА тест-системы 4 поколения (определяющие как антитела, так и антиген ВИЧ) или качественную (ДНК) ПЦР
- Быстрые тесты позволяют предварительно заподозрить диагноз ВИЧ инфекции и применяются в первую очередь в экстренных ситуациях (обследование беременных, поступивших рожать с неизвестным ВИЧ-статусом, и обследование биоматериала при профессиональных контактах)
- Уровень CD4, наряду с клинической картиной, используется для определения стадии ВИЧ-инфекции – и это отражено в клинических классификациях ВИЧ-инфекции
- Подъем вирусной нагрузки может указывать на начало прогрессирования ВИЧ-инфекции (прогноз), но не является констатирующим стадию ВИЧ-инфекции показателем. Вирусная нагрузка – главный показатель эффективности АРТ, обязательно контролируемый на фоне проведения лечения
- Уровень CD4 и вирусная нагрузка – весьма нестабильные показатели, их клиническая интерпретация возможна только при получении как минимум двух согласующихся результатов в динамике (взятых с интервалом ~ 1-3-6 месяцев, в зависимости от состояния пациента)
- Качество лабораторных исследований напрямую зависит от соблюдения правил забора и транспортировки материала



Образовательные ресурсы

□ обзор

Спасибо за ваше внимание!

