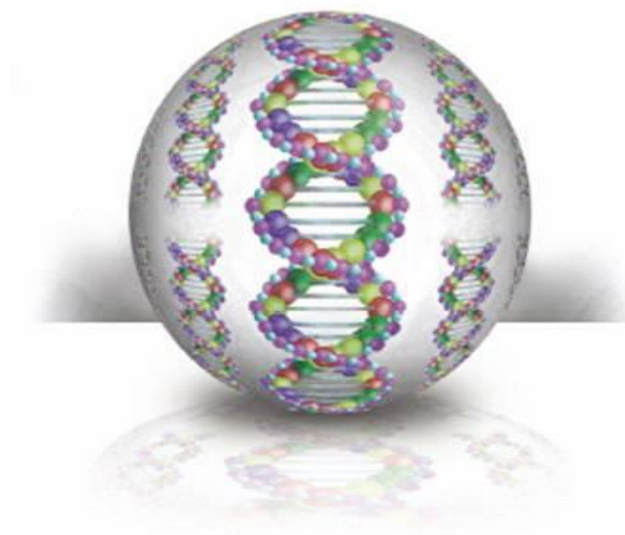


Лабораторная диагностика при ВИЧ-инфекции



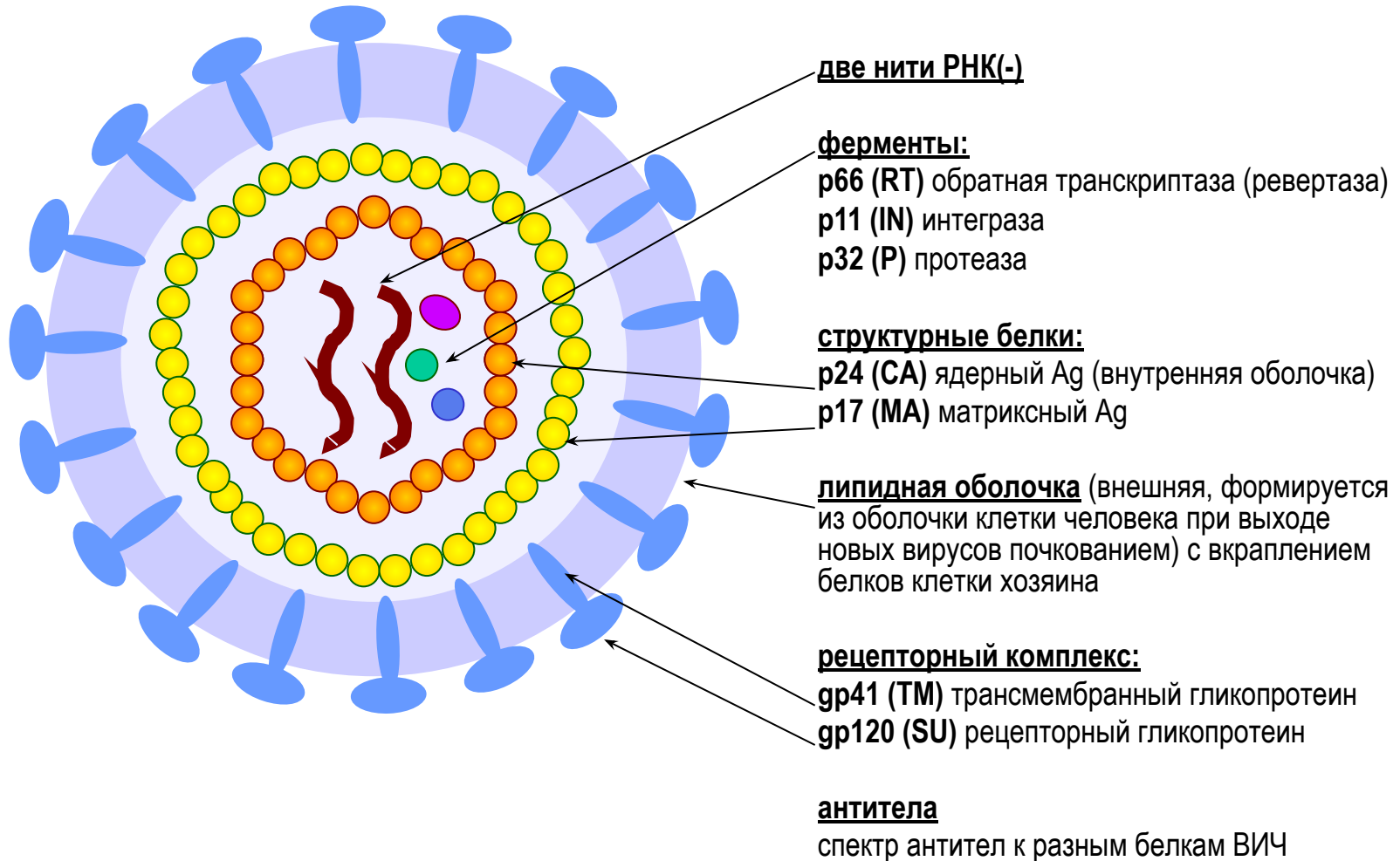


- презентация составлена на кафедре детских инфекционных болезней Государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования» (БелМАПО), Минск, Беларусь (зав. кафедрой профессор А.А. Ключарева)
- презентация используется при обучении слушателей на курсах повышения 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

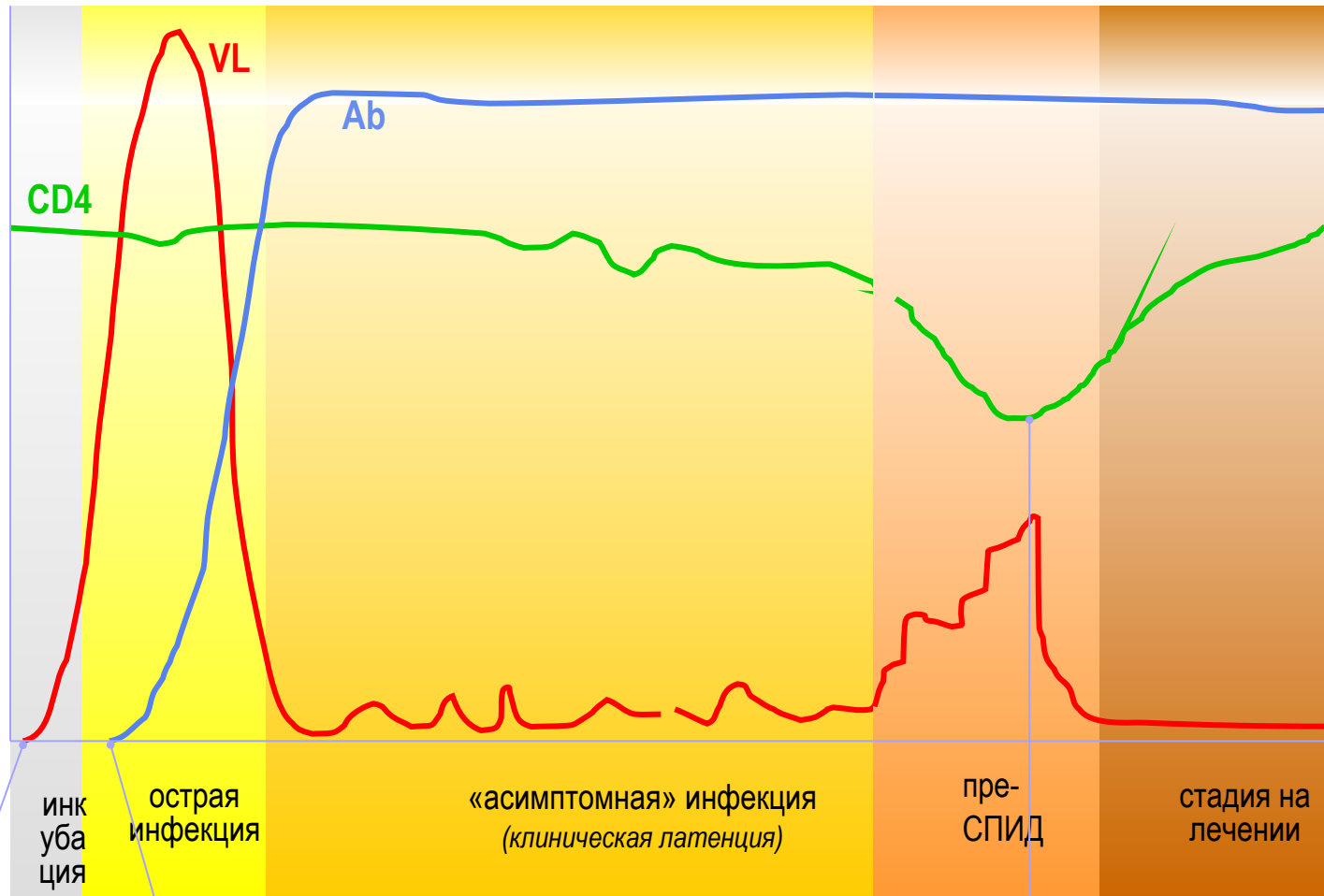
Задачи лабораторной диагностики ВИЧ

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 блоттинг (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

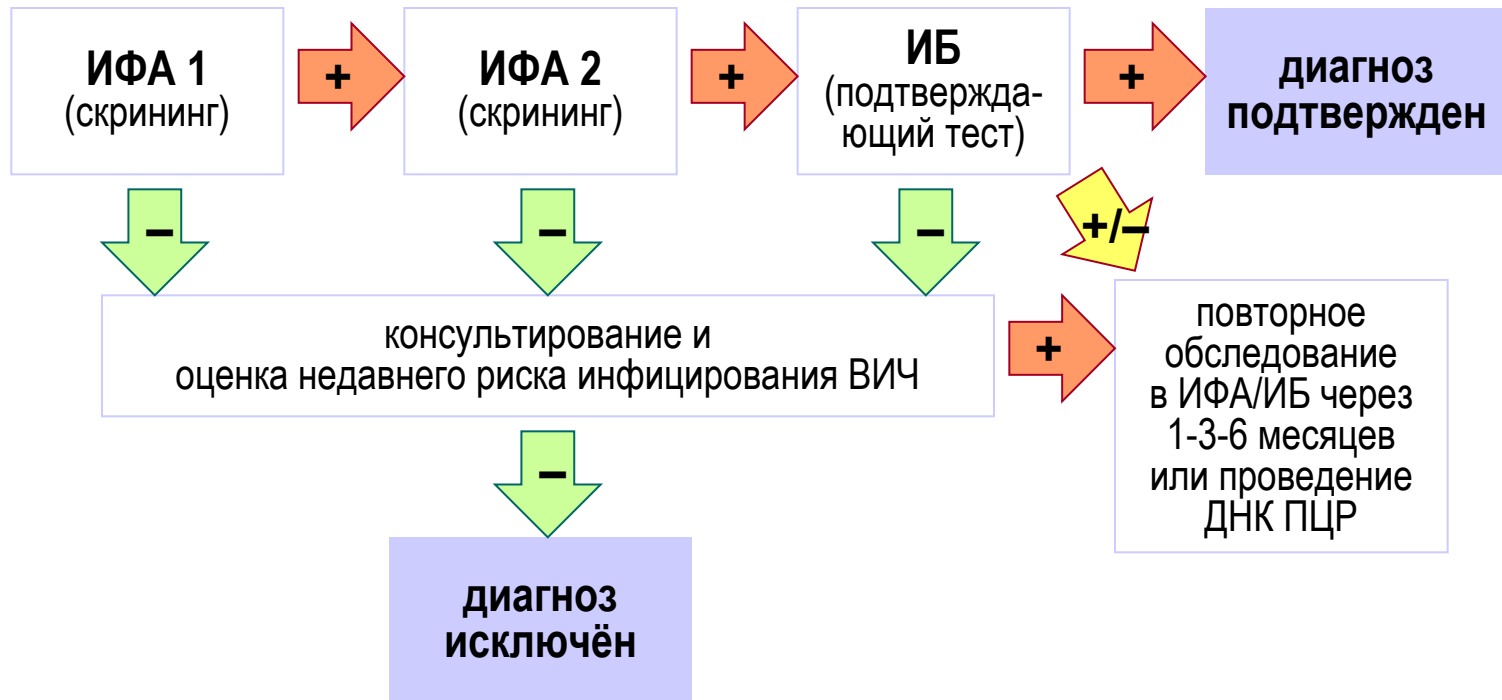
*предложение от врача
с возможностью отказаться*

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

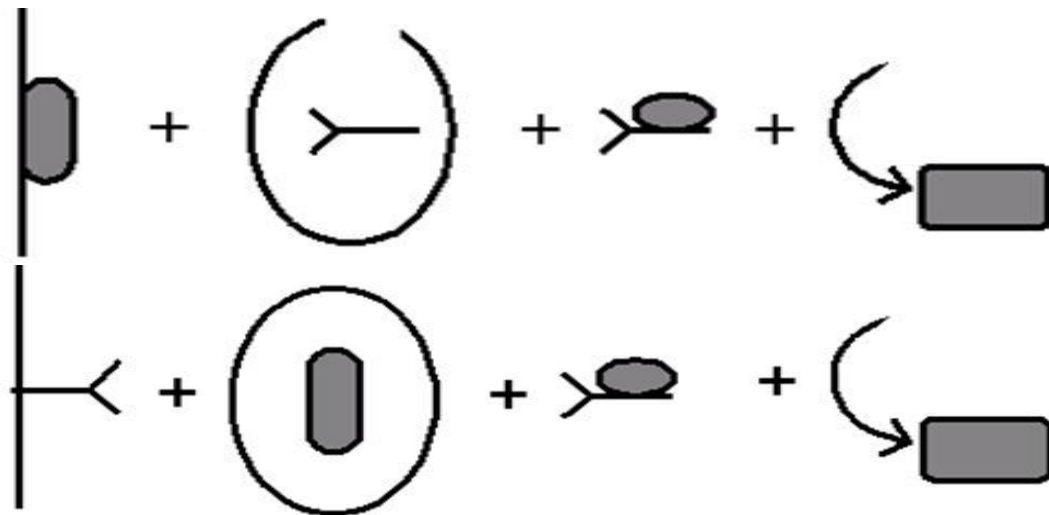
Диагностический алгоритм обследования на ВИЧ-инфекцию



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)

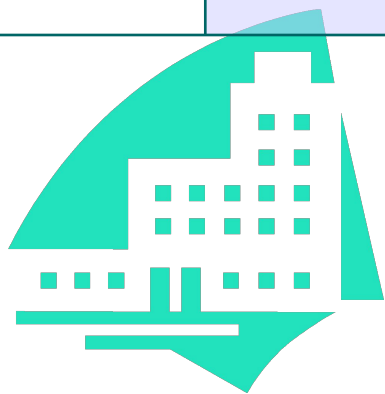
определяемые
Ab/Ag
(исследуемая
сыворотка)

конъюгат
фермента
и Ab

расщепление
хромогена с
образованием
окрашенного
комплекса

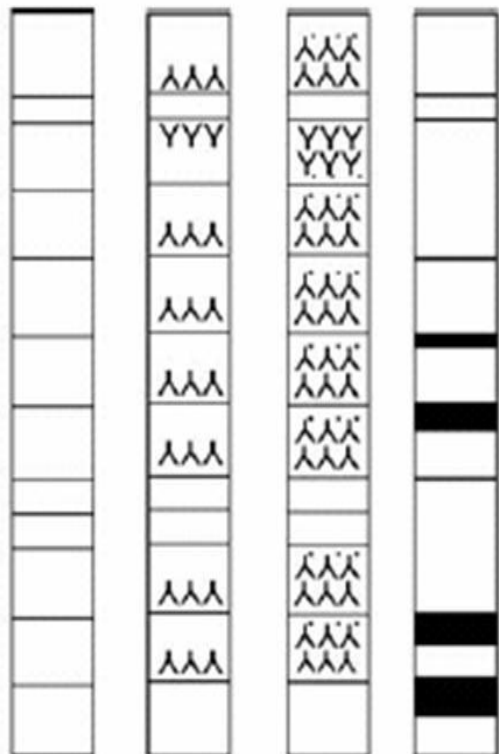
Поколения тестов для ИФА

	<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

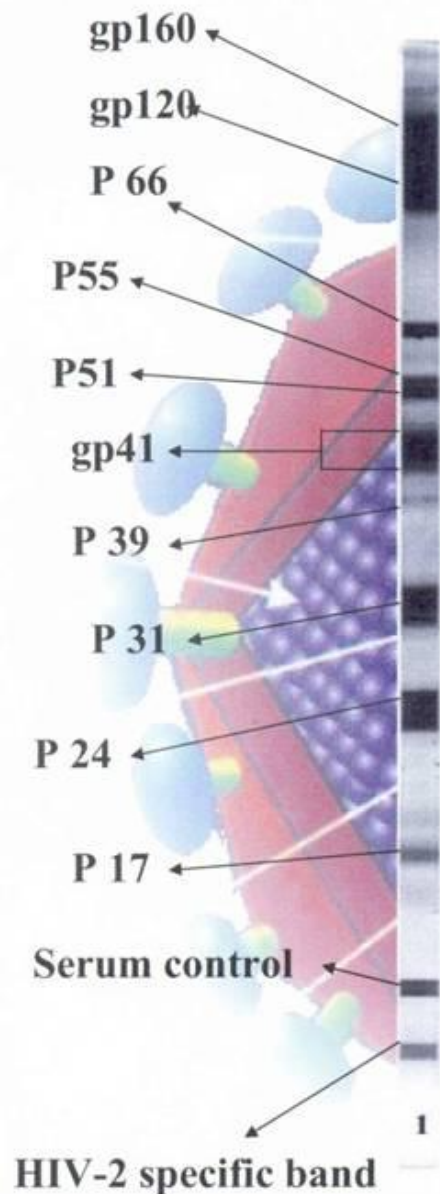


* p24 Ag есть в период окна, а затем появляются и обнаруживаются только anti-p24 – то есть ИФА 4поколения помогает в донорстве и у детей с перинатальным контактом, но он не заменяет ИБ как подтверждающий тест

ИБ (western blot): принцип метода



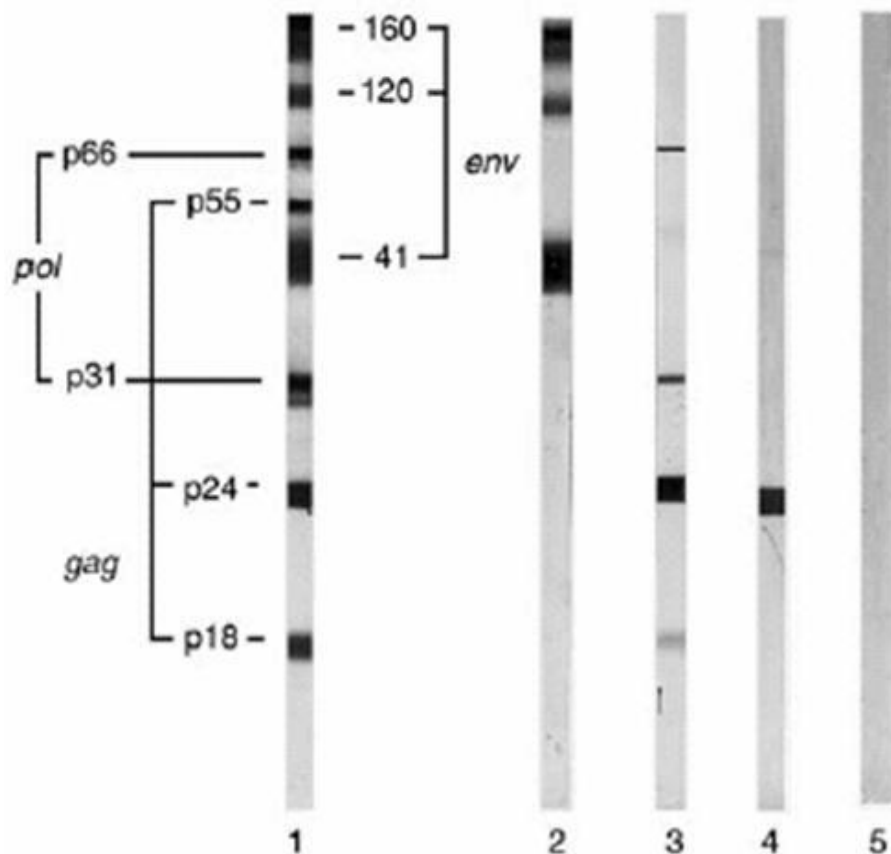
1. ЭФ разделение белков ВИЧ-1 (стандартный реагент) по их молекулярной массе
2. Инкубация с добавлением исследуемой сыворотки – **специфическое соединение белков ВИЧ с соответствующими отдельными антителами к ВИЧ из добавленной сыворотки**
3. Инкубация с добавлением меченных ферментом антител к человеческим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

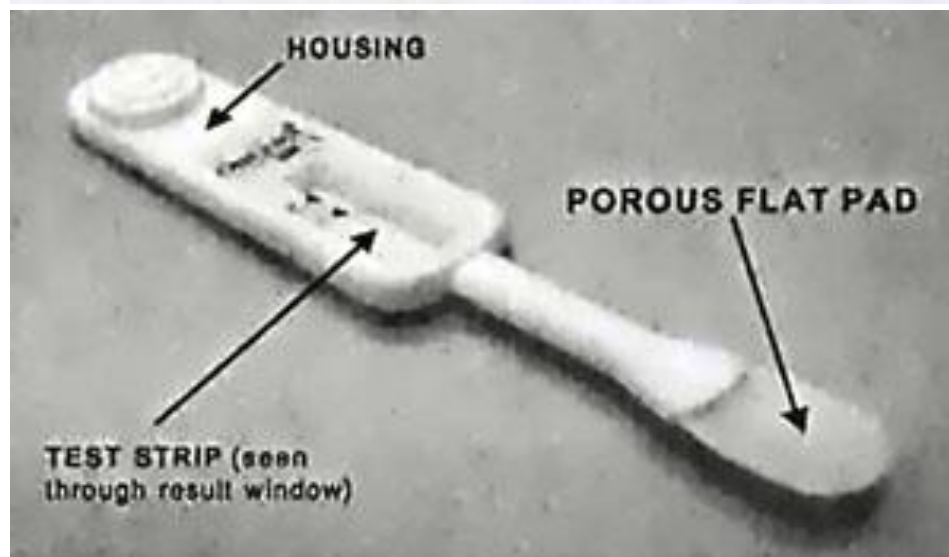
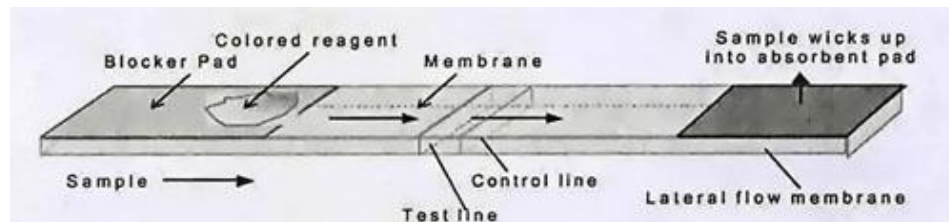
OraQuick® тестполоска

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

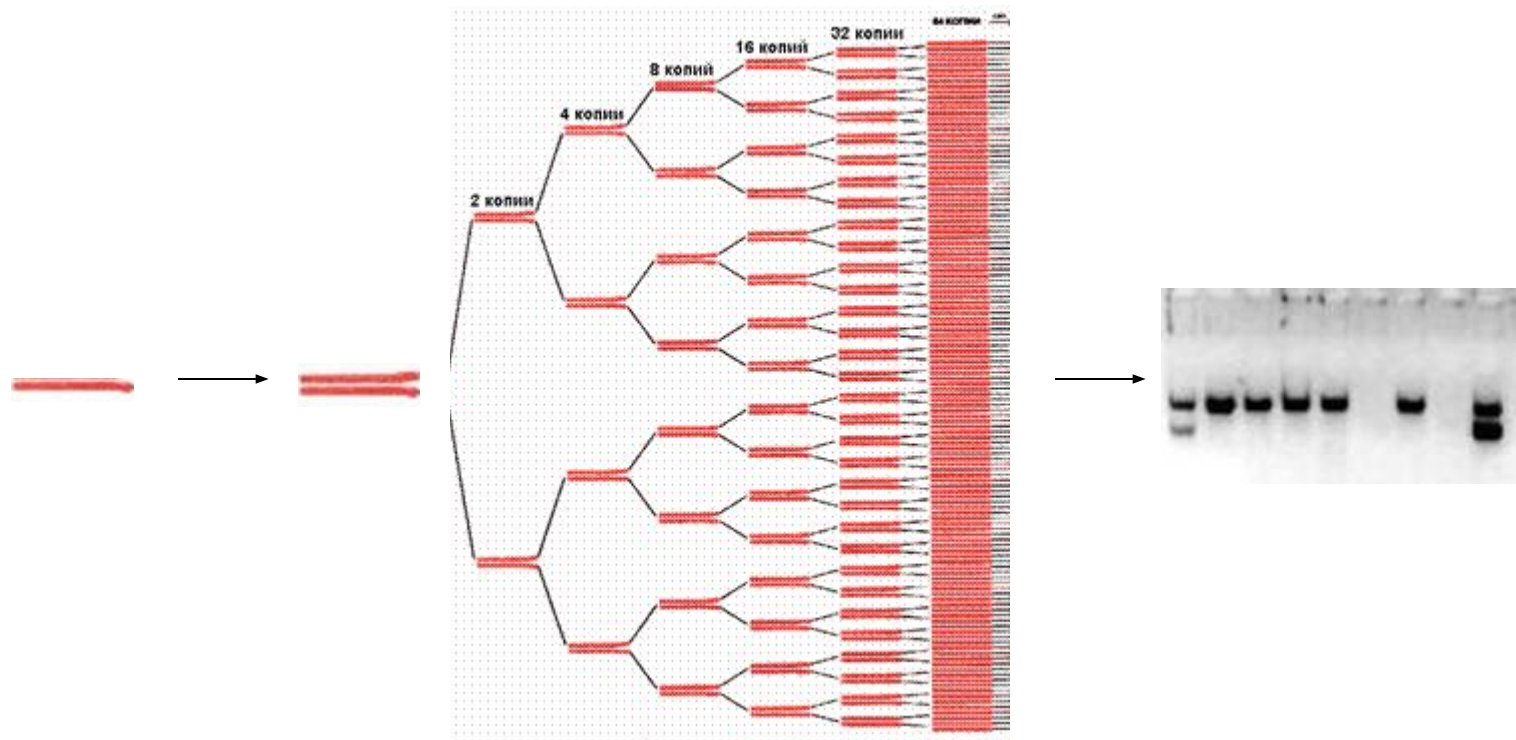
I have read and understand the informed consent found in the Directional Insert (1) and I am authorizing Home Access Health Corporation to test the attached blood spot sample for antibodies to HIV-1.

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

- **определение антител в трансудате 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

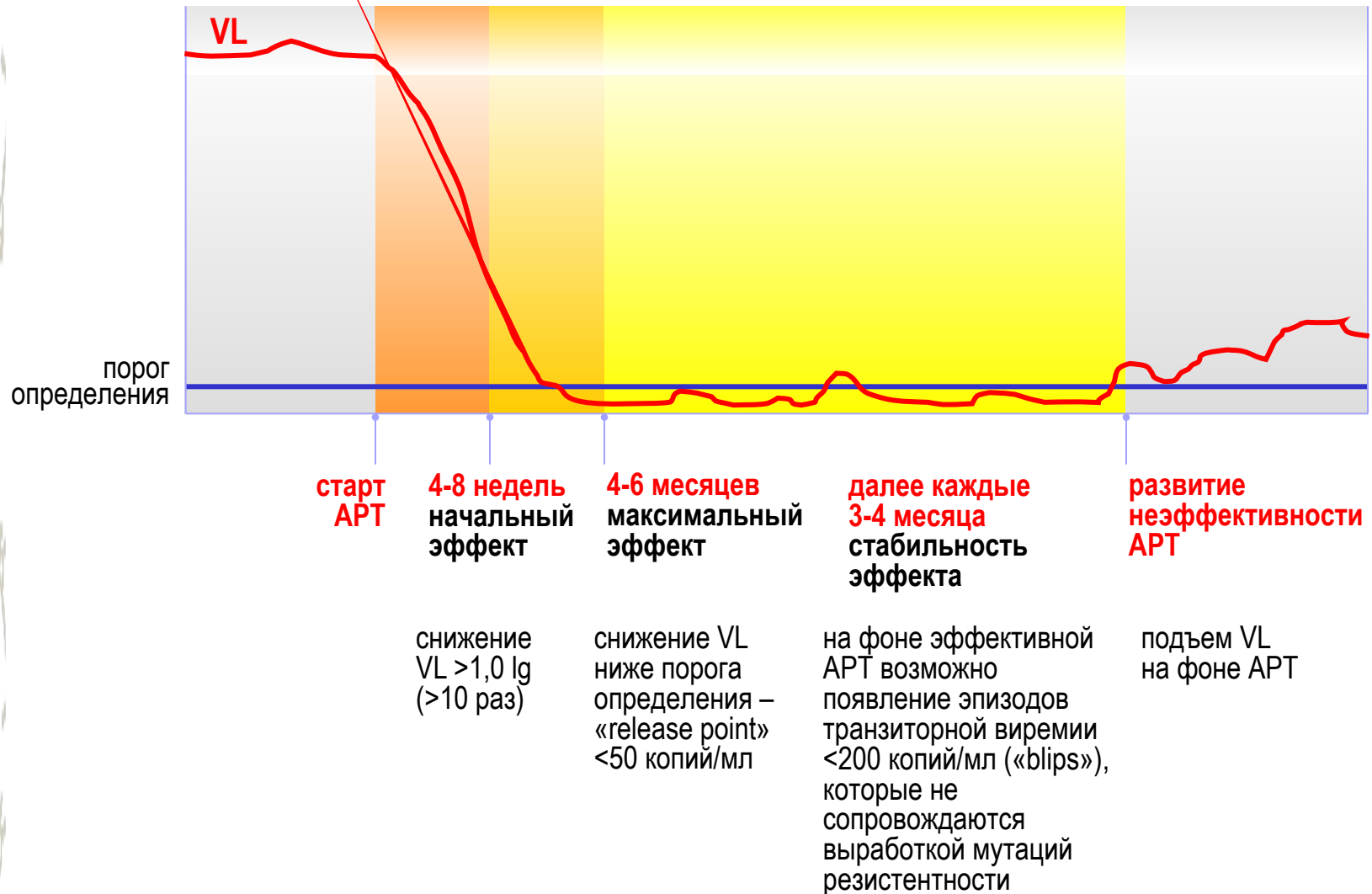
Ограничения в трактовке:

- 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?

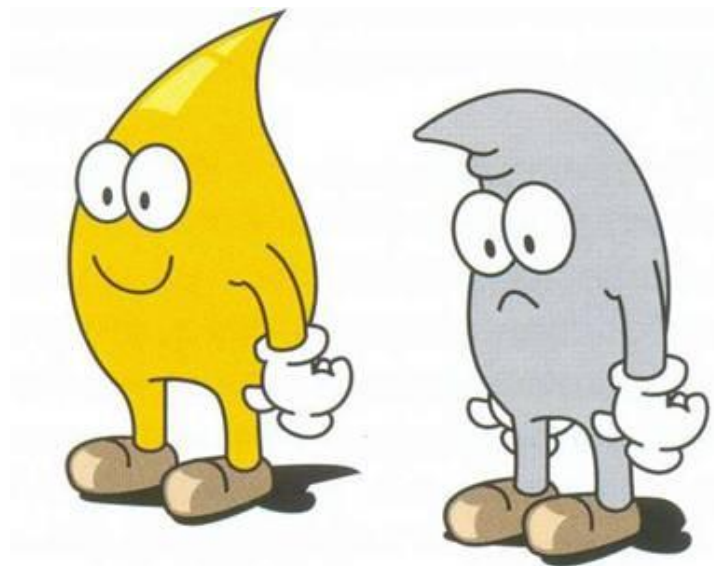
- исключение диагноза ВИЧ-инфекции ≠ снятие с дисп. учета
(≥ 2 отр. ДНК ПЦР) (≥ 2 отр. ИФА)

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

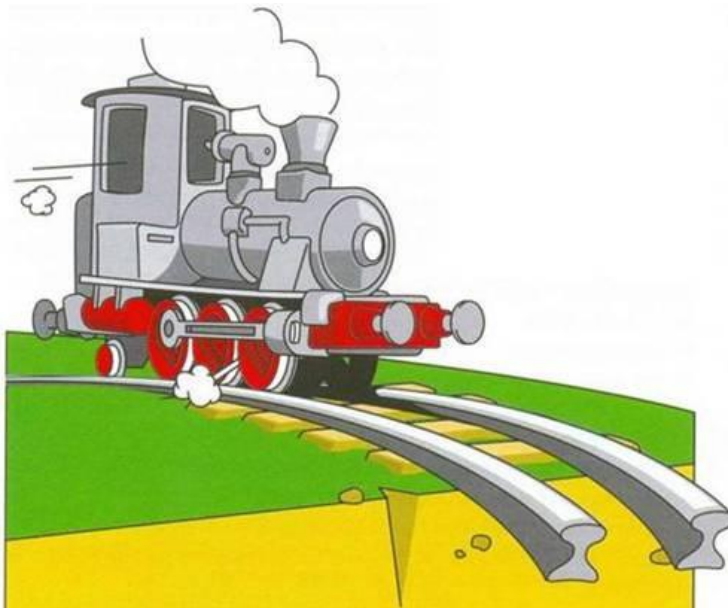
Ограничения в трактовке:

- 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!

