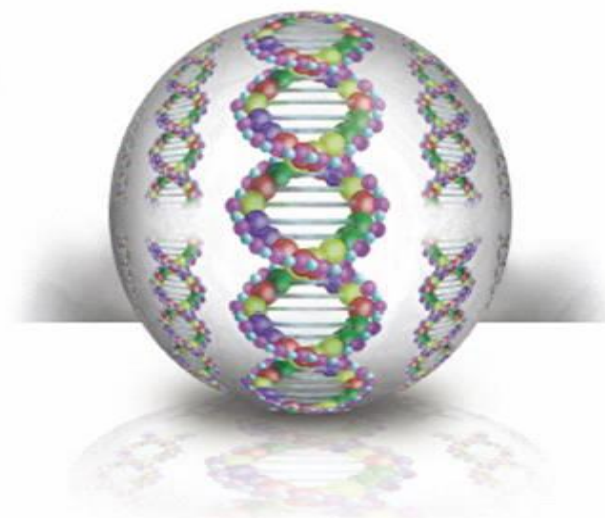


Лабораторная диагностика при ВИЧ-инфекции



Зав. КДЛ ГАУЗ АО «АККВД» Колобова А.Е.

Обследованием на ВИЧ в Архангельской области охвачено:

2016 год – 204008 чел (18,2%)

2017 год – 233466 чел (20,8%)

2018 год – 267143 чел (24,0%)

Основные направления развития лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции на современном этапе

- Совершенствование лабораторного оборудования, автоматизация процессов
- Применение для скрининга тест-систем 4 поколения, позволяющих выявлять наряду с антителами антиген ВИЧ-белок p24
- Развитие экспресс-диагностики
- Широкое внедрение метода ПЦР
- Многоступенчатый контроль качества

Основная задача - качественное лабораторное сопровождение пациента

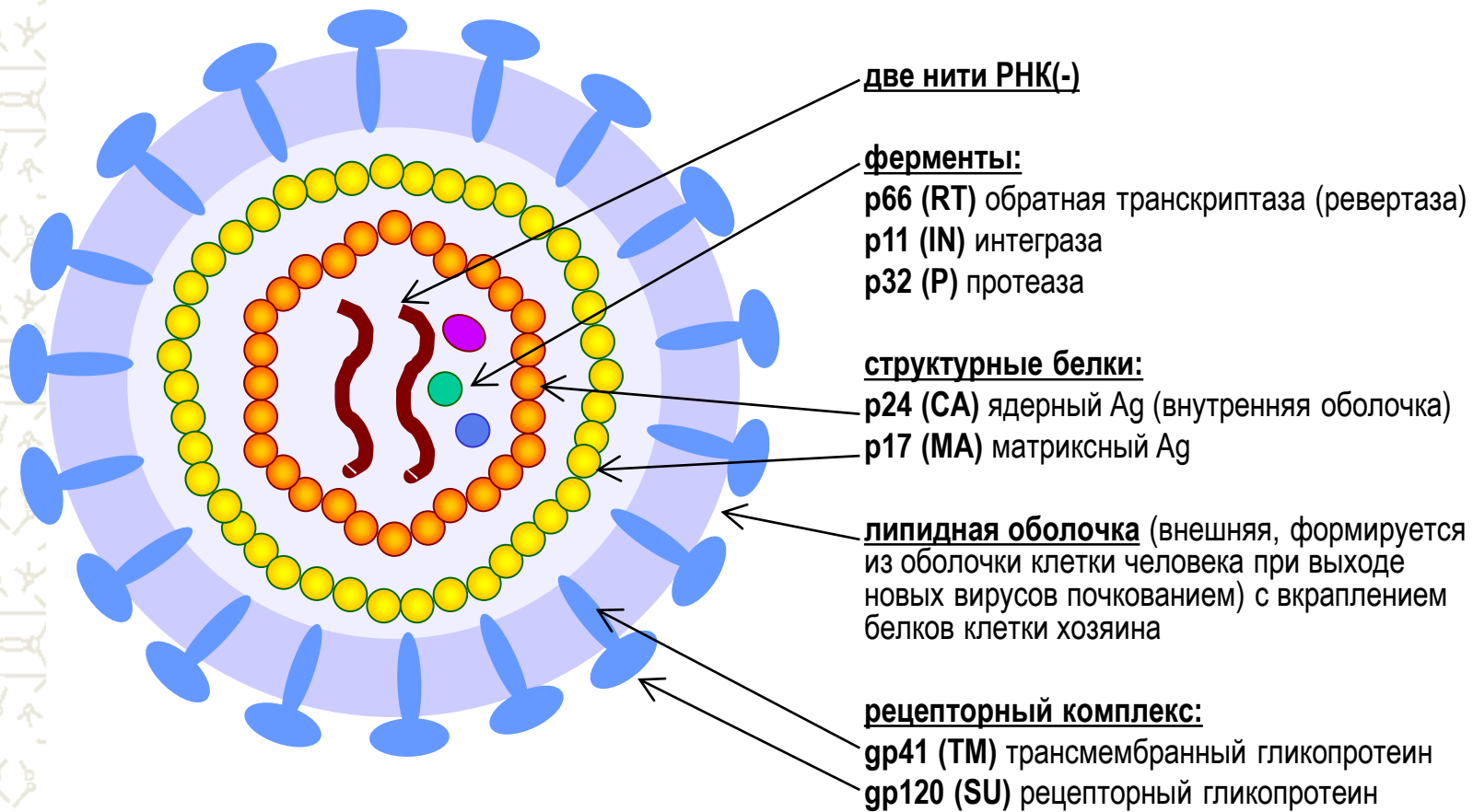
Задачи лабораторной диагностики ВИЧ

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

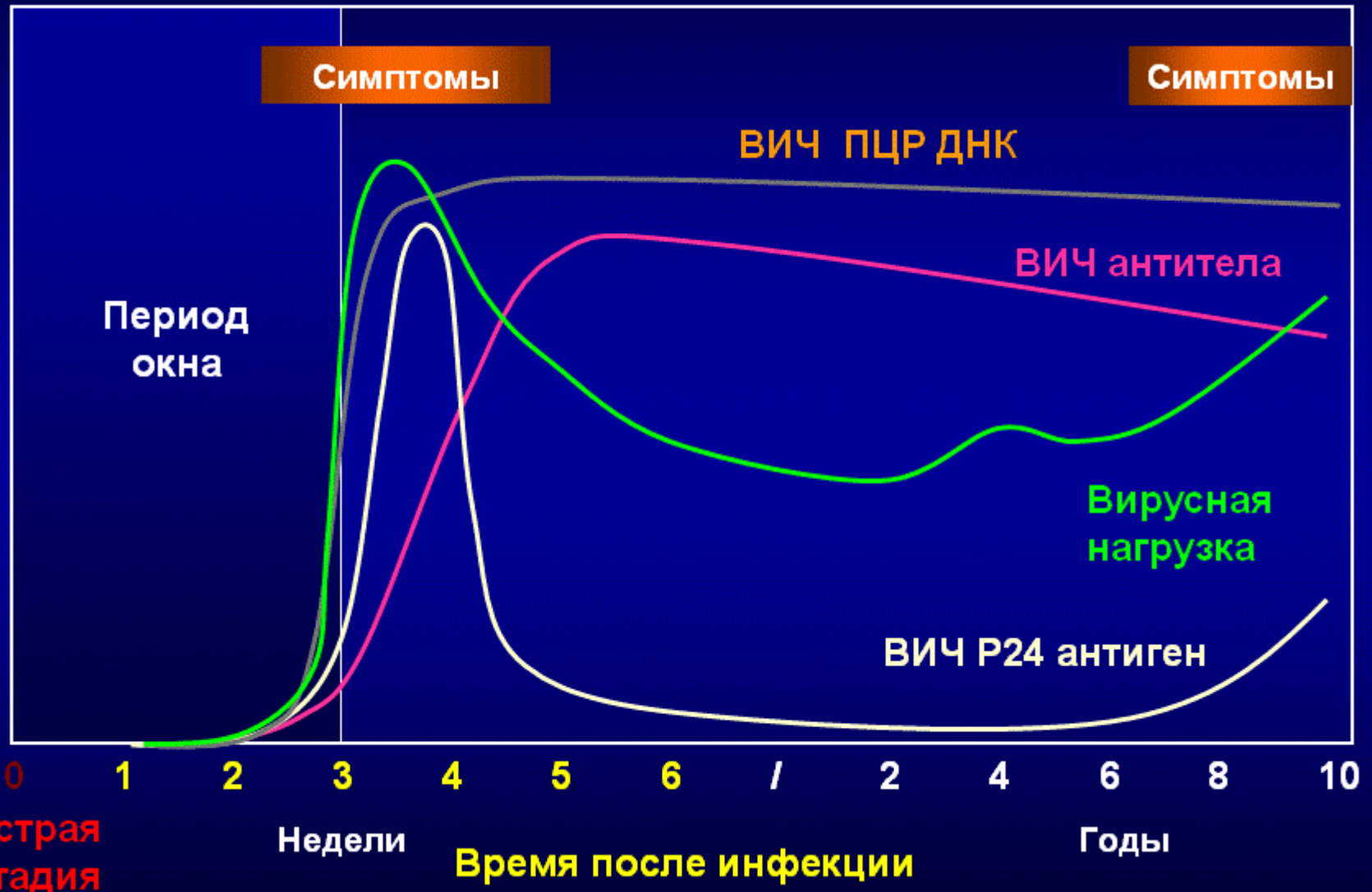
Строение ВИЧ: что же мы определяем лабораторно?



антитела

спектр антител к разным белкам ВИЧ

Естественное течение ВИЧ-инфекции: клинико-лабораторные параллели



Лабораторные маркеры ранней ВИЧ-инфекции

- На **7-11** день от заражения появляются молекулярные маркеры – **РНК и провирусная ДНК ВИЧ**
- На **15-16** день от заражения появляется **p24-антиген**
- На **21-28** день от заражения происходит сероконверсия и появляются **антитела** против **p24, gp41 и gp120**. Сероконверсия может задерживаться до 3-6 месяцев

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?

тестирование
на ВИЧ

добровольное исключение

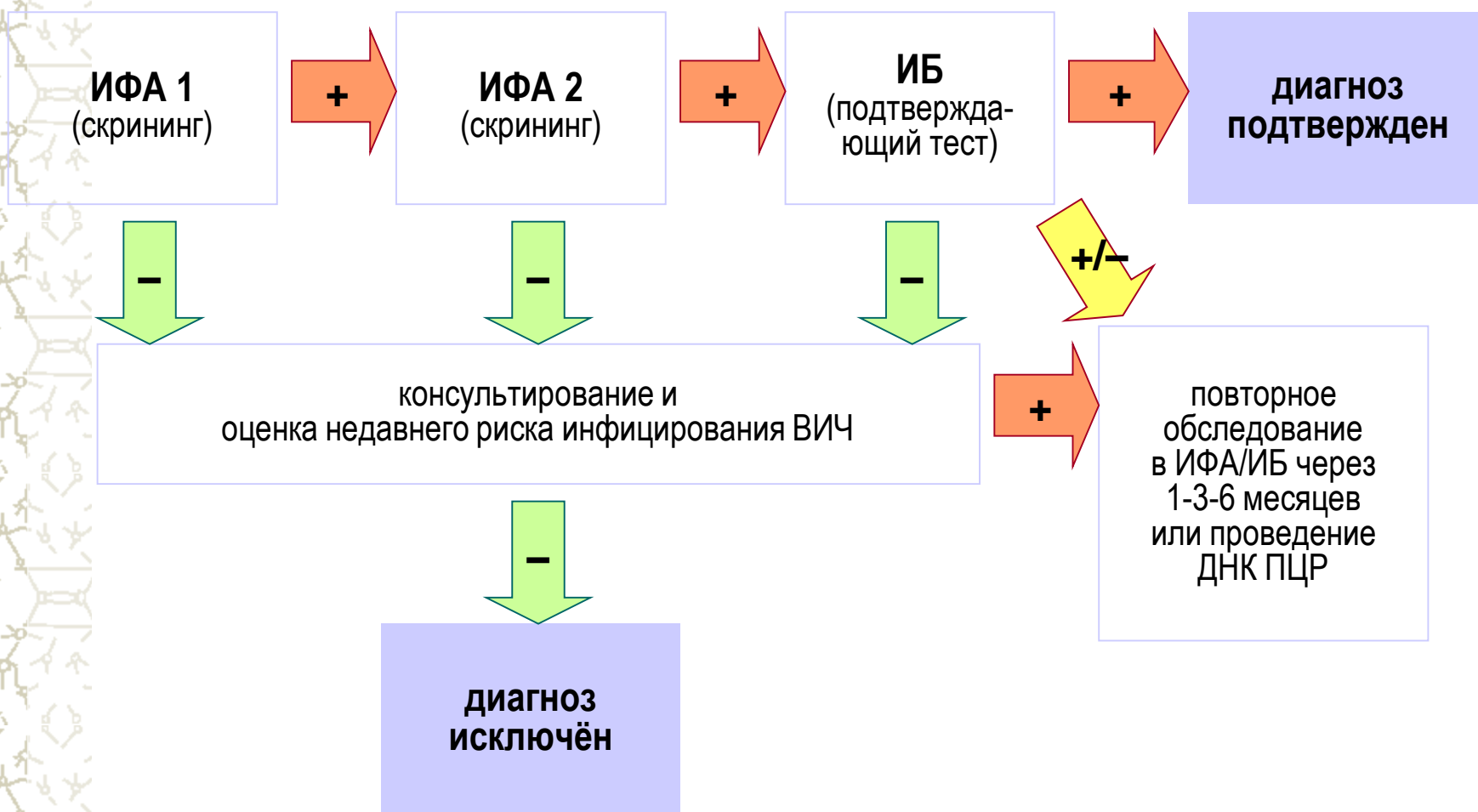
*предложение от врача
с возможностью отказаться*

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, КСР
- поступившие в следственный изолятор или приемник-распределитель
- медработники в случае профессионального контакта
- все изъявившие пройти обследование, в том числе анонимно

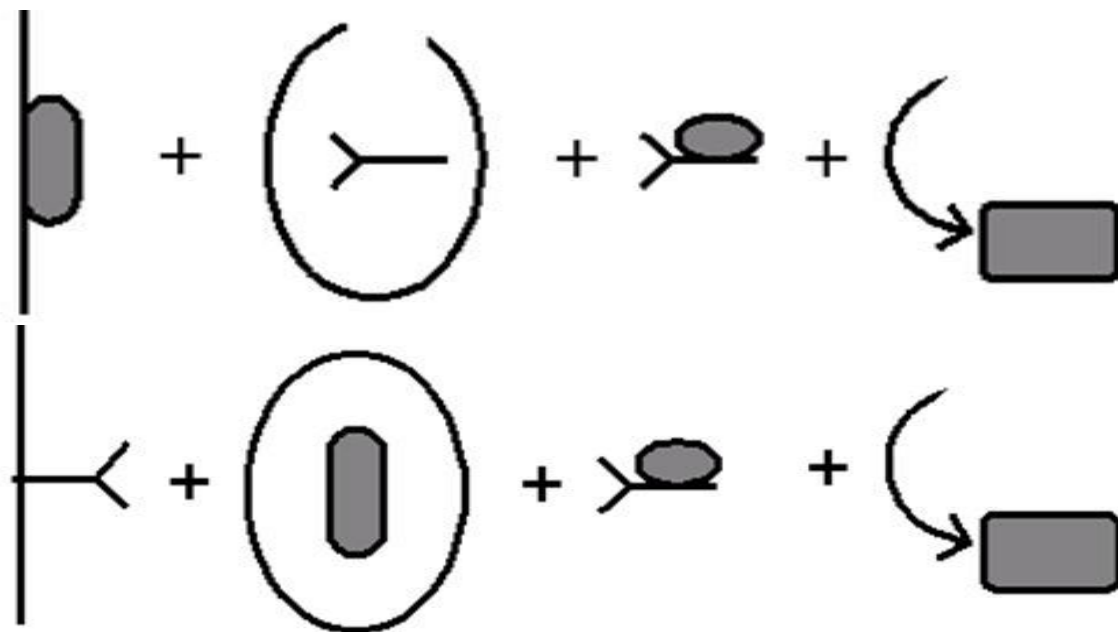
Диагностический алгоритм обследования на ВИЧ-инфекцию



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)

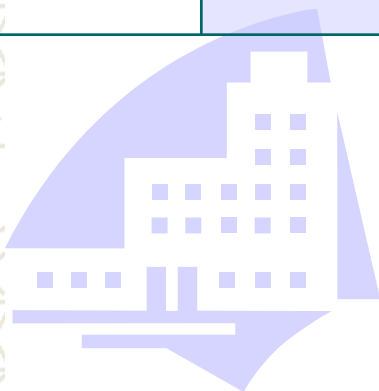
определяемые
Ab/Ag
(исследуемая
сыворотка)

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 4 поколения помогает в донорстве и у детей с перинатальным контактом, но он не заменяет ИБ как подтверждающий тест

Первый этап – скрининговая лаборатория

- Если получен положительный результат в ИФА, анализ проводится последовательно еще 2 раза (с той же сывороткой и в той же тест-системе, вторая сыворотка запрашивается только в случае невозможности направления для дальнейшего исследования первой сыворотки).
- Если получены два положительных результата из трех постановок в ИФА, сыворотка считается первично-положительной и направляется в референс-лабораторию (Лаборатория диагностики ВИЧ-инфекции центра по профилактике и борьбе со СПИД) для дальнейшего исследования.



Направление на арбитраж

АРБИТРАЖ

ГБУЗ Архангельской области «Первая городская клиническая больница им. Е.Е. Волосевич»
Бактериологическая лаборатория

РЕЗУЛЬТАТ
исследования крови на ВИЧ методом ИФА

147
27 НОЯ 2019

Дата забора материала 26.11.19
Ф.И.О. [REDACTED] возраст 01.01.2000
адрес г. Архангельск, [REDACTED]
код 183
Отделение 146 № истории болезни _____

| Наименование исследования | результат |
|---------------------------|---------------------|
| АТ к ВИЧ - 1,2 + р24 - АГ | ОП кр. <u>0,169</u> |
| | ОП обр. <u>1,39</u> |

ФИО проводившего исследование [REDACTED] дата выдачи результата 27.11.19

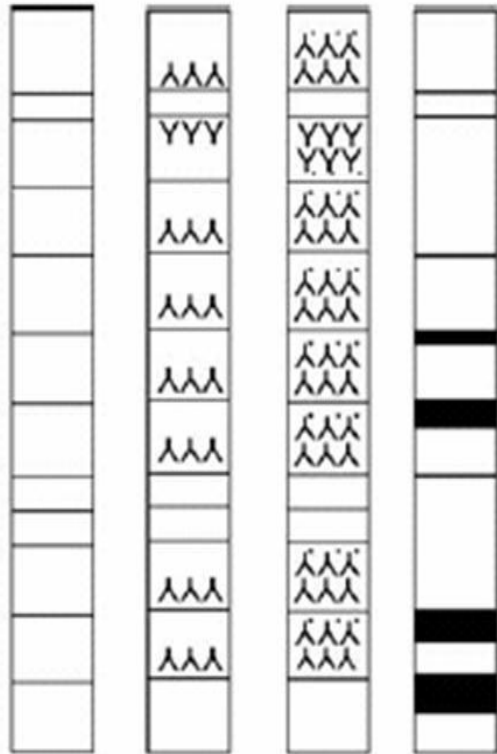
тест-система КомбиБест ВИЧ-1,2 АГ/АТ (серия 439), срок годности 09.20

Второй этап (референс-лаборатория).

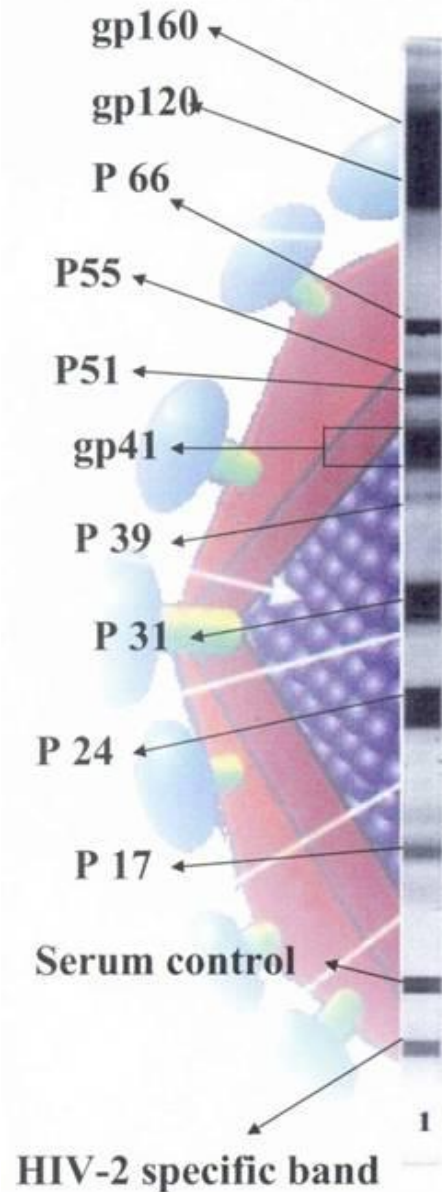
- Первично положительная сыворотка повторно исследуется в ИФА во второй тест-системе другого производителя, отличающейся от первой по составу
- При получении отрицательного результата сыворотка повторно исследуется в третьей тест-системе другого производителя, отличающейся от первой и второй по составу антигенов, антител или формату тестов.
- В случае получения отрицательного результата (во второй и третьей тест-системах) выдается заключение об отсутствии антител к ВИЧ.
- При получении положительного результата (во второй и/или третьей тест-системе) сыворотку необходимо исследовать в иммунном или линейном блоте.



ИБ (western blot): принцип метода



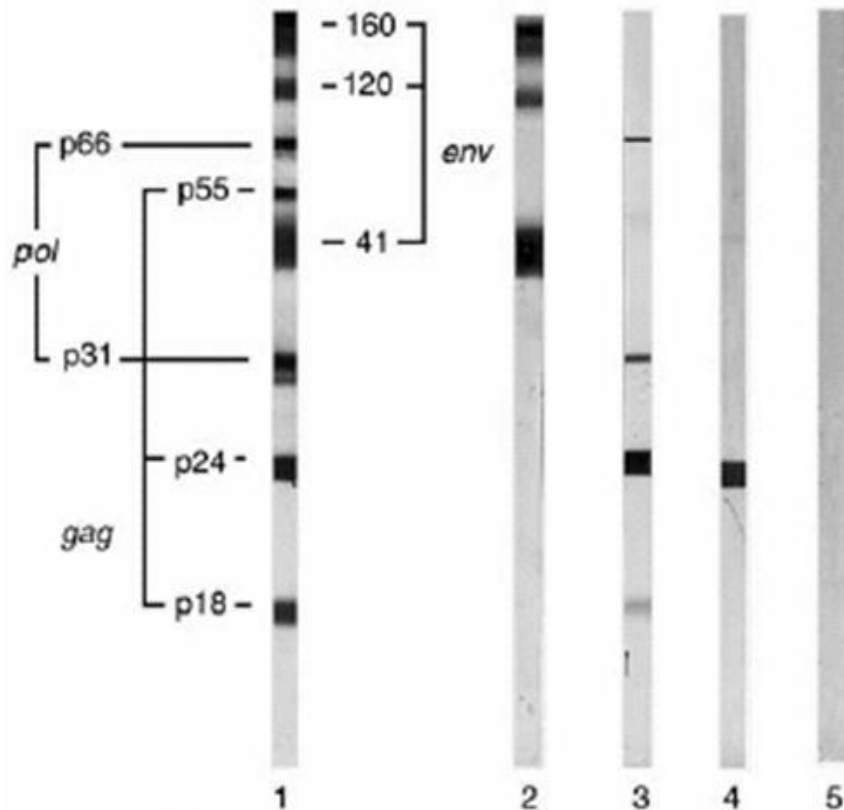
1. ЭФ разделение белков ВИЧ-1 (стандартный реагент) по их молекулярной массе
2. Инкубация с добавлением исследуемой сыворотки – **специфическое соединение белков ВИЧ с соответствующими отдельными антителами к ВИЧ из добавленной сыворотки**
3. Инкубация с добавлением меченных ферментом антител к человеческим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



ИБ: трактовка результатов

Критерии положительного ИБ :

- Положительными (позитивными) считаются пробы, в которых обнаруживаются антитела к 2 из 3 гликопротеинов ВИЧ (*env*, *gag*, *pol*). (**СП 3.1.5.2826-10 «Профилактика ВИЧ-инфекции»**) или два *env* (*gp41*, *gp160*, *gp120*) – рекомендации ВОЗ



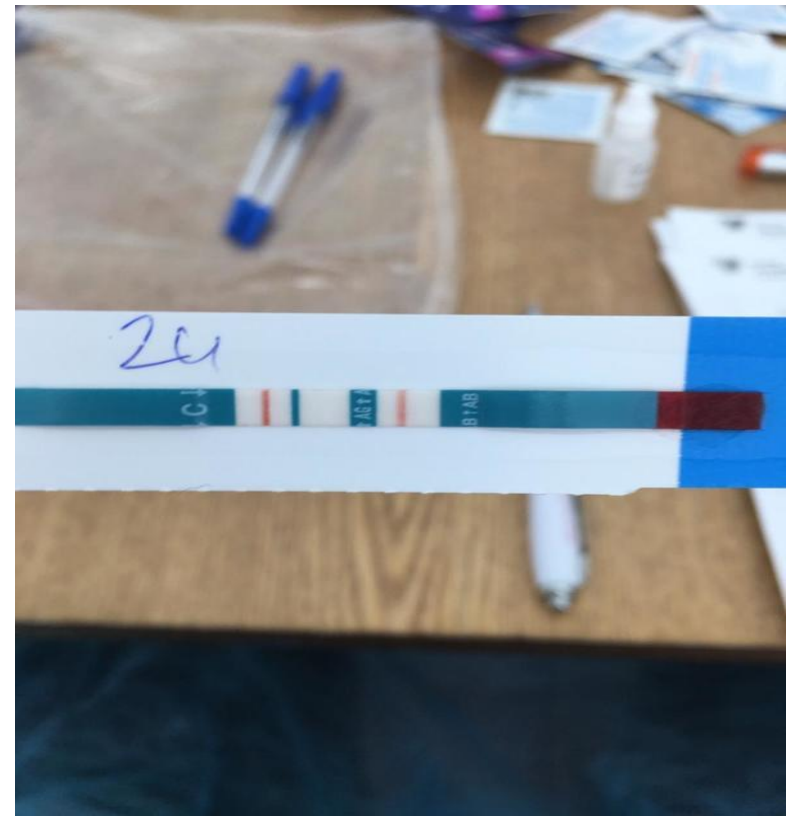
1. Положительный ИБ к ВИЧ-1
2. Отрицательный ИБ (у здорового человека, иммунизированного белками внешней оболочки ВИЧ-1)
3. Сомнительный ИБ (у инфицированного ВИЧ-2)
4. Сомнительный ИБ (наличие антител, перекрестно реагирующих с p24 Ag)
5. Отрицательный ИБ

Если результат отрицательный (сомнительный)

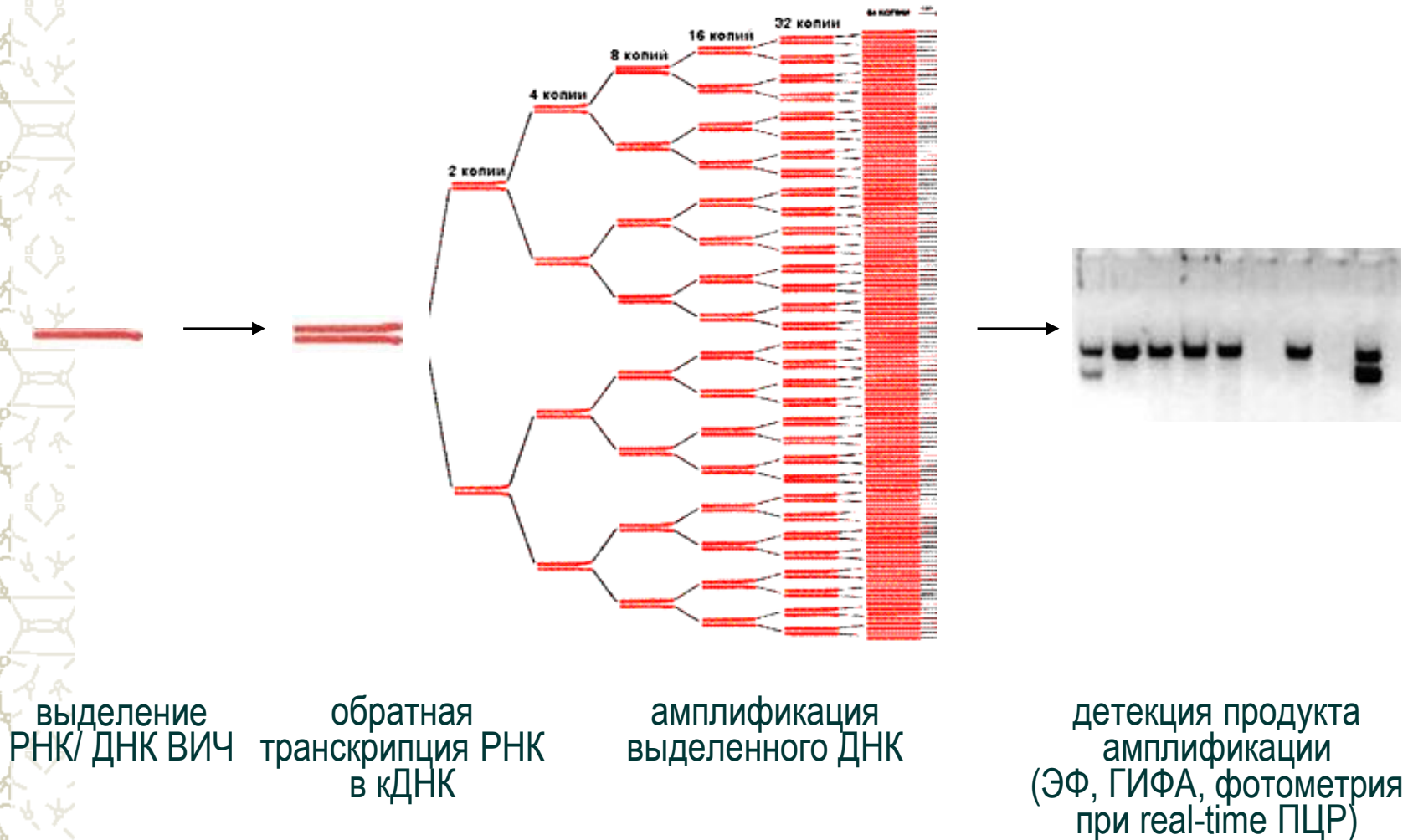
- При получении такого результата в иммунном или линейном блоте рекомендуется исследовать сыворотку в тест-системе для определения р24 антигена или ДНК/РНК ВИЧ.
- Если был выявлен антиген р24 или ДНК/РНК ВИЧ, повторное обследование в иммунном блоте проводится через 2, 4, 6 недель после получения первого неопределенного результата.
- При получении неопределенного результата проводятся повторные исследования на антитела к ВИЧ в иммунном или линейном блоте через 2 недели, 3 и 6 месяцев. Если получены отрицательные результаты в ИФА, то дальнейшее исследование не требуется.
- Если через 6 месяцев после первого обследования вновь будут получены неопределенные результаты, а у пациента не будут выявлены факторы риска заражения и клинические симптомы, то результат расценивается как ложноположительный.

Быстрые тесты

- Выявление антител к ВИЧ 1 и ВИЧ 2 – 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



ПЦР: принцип метода



Детекция продуктов амплификации



Качественная и количественная ПЦР

| | что определяет | материал для исследования | клиническое использование |
|--|--|---|---|
|  <p>качественная</p> | <p>ДНК-ПЦР: наличие ДНК ВИЧ, интегрированного в геном клетки-мишени (лимфоцита) – резервуара инфекции</p> | <p>культура лимфоцитов крови</p> | <p>определение ВИЧ-статуса:</p> <ul style="list-style-type: none">- 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) |
|  <p>количественная (VL, вирусная нагрузка)</p> | <p>РНК-ПЦР: наличие РНК свободных вирионов ВИЧ, находящихся в плазме</p> | <p>плазма крови</p> | <p>прогнозирование течения ВИЧ-инфекции у пациентов без терапии;</p> <p>контроль эффективности АРТ (стартовая VL и в динамике);</p> <p>выбор тактики родоразрешения у ВИЧ+ беременных</p> |

Что такое «вирусная нагрузка»?

Вирусная нагрузка – это концентрация РНК ВИЧ в крови.

Концентрация РНК ВИЧ измеряется:

- а) в количестве копий РНК ВИЧ в мл крови**
- б) в десятичных логарифмах.**

Поскольку в каждом вирусе иммунодефицита человека содержатся две копии РНК, количество вирусных частиц в крови в два раза меньше, чем показатель «вирусной нагрузки»

Определение содержания РНК ВИЧ (вирусной нагрузки) проводится:

- при постановке на диспансерный учет
- при плановом обследовании для определения показаний к началу АРВ (не менее 1 раза в год)
- в ходе диспансерного наблюдения за пациентами, получающими АРВ терапию, для оценки эффективности терапии (не менее 4 раз в год)

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 | до 6 ч при +2+8°C (РНказы!) |
| | | | выделение плазмы – центрифугирование 80-100 об/мин 20 мин | до 1 суток при +2+8°C, заморозка: -20°C – 1 месяц -80°C – 6 месяцев |

Спасибо за Ваше внимание!

