

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Северо-западный государственный медицинский университет имени
И.И.Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России)
Кафедра инфекционных болезней

ВИЧ-инфекция: этиопатогенез и лабораторная диагностика

Учебное пособие для врачей

Санкт-Петербург, 2017.

УДК: 616.98.07-097

ББК 55.148

ВИЧ-инфекция: этиопатогенез и лабораторная диагностика: Учебн.
пособие для врачей / Г.И. Кирпичникова, Г.Ю. Старцева; под ред. Ю.В.
Лобзина. – СПб., 2017. – с. 76.

Медицинская помощь при ВИЧ-инфекции начинается с лабораторного тестирования. Авторы на основании руководящих документов и многолетнего собственного опыта авторов в данном пособии достаточно подробно осветили вопросы этиологии, патогенеза и диагностики ВИЧ-инфекции. Особое внимание уделено алгоритмам применения лабораторных методов в диагностике, интерпретации результатов исследований, значению молекулярно-генетических тестов в мониторинге вирусной нагрузки и резистентности в процессе лечения.

Пособие предназначено для интернов, ординаторов и врачей, обучающихся в системе дополнительного профессионального образования, по специальностям: Инфекционные болезни, Клиническая лабораторная диагностика, Общая врачебная практика (семейная медицина).

Рецензенты:

—

Утверждено в качестве учебного пособия Методическим советом ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И.И.Мечникова»

Протокол № _4 от «_01»___декабря__2017 г.

Коллектив авторов, 2017 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА I ЭТИОЛОГИЯ И ПАТОГЕНЕЗ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ	7
1.1. Этиология ВИЧ-инфекции	7
1.1.1. Строение ВИЧ	7
1.1.2. Репликация ВИЧ	9
1.1.3. Вариабельность и генетические факторы иммунитета к ВИЧ	11
1.1.4. Фенотипы и генотипы ВИЧ	12
1.2. Патогенез ВИЧ-инфекции	13
1.2.1. Клетки мишени и механизмы разрушения клеток	13
1.2.2. Устойчивость ВИЧ	16
Глава II ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИЧ-ИНФЕКЦИИ	17
2.1. Иммунохимические методы диагностики (ИФА, ИБ)	17
2.1.1. Требования, предъявляемые к забору материала для исследования методом ИФА	17
2.1.2. Принцип ИФА	18
2.1.3. Алгоритм диагностики ВИЧ-инфекции	20
2.1.4. Причины ложных результатов в ИФА	23
2.1.5. Иммуноблот (ИБ)	24
2.1.6. Особенности диагностики ВИЧ-инфекции у детей	25
2.1.7. Экспресс-тесты	27
2.1.8. Порядок освидетельствования на ВИЧ-инфекцию	28
2.1.9. Алгоритм диагностики донорской крови.	32
2.2. Молекулярно-генетические тесты	35
2.2.1. Забор и хранение материала для иммунологических и молекулярно-генетических исследований	35
2.2.2. Принцип ПЦР	37
2.2.3. Методика постановки ПЦР	39
2.2.4. Вирусная нагрузка	41
2.2.5. Резистентность ВИЧ	43
2.3. Культивирование ВИЧ in vitro	49
2.4. Исследование методом проточной цитометрии	50
2.5. Тактика использования лабораторных методов в диагностике и мониторинге ВИЧ-инфекции	58
Глава 3. Профилактика профессионального инфицирования ВИЧ	59
Рекомендуемая литература	62
Нормативные правовые акты	62
Приложение 1	66
<i>Журнал учета аварийных ситуаций по риску профессионального заражения ВИЧ-инфекцией медицинских работников (образец)</i>	

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

BBI	– Boston Biomedical Inc.
BST-2	– трансмембранный белок от англ. «bone marrow stromal antigen-2»
CCR5, CCR2	– гены, определяющие устойчивость к ВИЧ
CD	– CD-позитивные Т-лимфоциты (от англ. «clusters of differentiation»)
CDC	– Centers for Diseases Control and Prevention (Центр контроля и профилактики заболеваний США)
CTL	– цитотоксические Т-лимфоциты
CXCR4 и CCR5	– хемокиновые рецепторы
DC-SIGN	– англ. аббр. Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
ELISA	– тест-системы ИФА (от англ. enzyme-linked immunosorbent assay)
env	– гены оболочки (от англ. «envelope» - «оболочка»)
gag,	– группоспецифический ген (от англ. «group-specific antigens»)
HLA	– главный комплекс гистосовместимости (от англ. «Human leukocyte antigen»)
HTLV	– Human T-lymphotropic virus
LTR	– от англ. «long terminal repeat»
nef	– negative regulatory factor
NK	– natural killer
PLG	– ген, кодирующий плазминоген
pol ,	– ген, кодирующий ферментные системы вируса (от англ. «polymerase»)
rev	– regulator of expression of virus proteins
RT-PCR	– «real time» полимеразная цепная реакция
SIV, nef SIV	– ретровирус обезьян
tat	– transactivator of transcription
TRIM5a	– протеин, содержащийся у макаков-резус
vif	– virion infectivity factor
VL, ВН	– вирусная нагрузка (от англ. «viral load»)
vpr	– virus protein R
vpu	– virus protein U
vpx	– virus protein X
АТ (или Ab)	– антитела (от англ. «antibody»)
АГ (или Ag)	– антиген (от англ. «antigen»)
АРВ	– антиретровирусный
АРВТ, ВААРТ	– антиретровирусная терапия, высокоактивная антиретровирусная терапия
АРП	– антиретровирусные препараты

ВИЧ (HIV)	– вирус иммунодефицита человека (англ. «human immunodeficiency virus»)
ВОЗ	– Всемирная организация здравоохранения
ГТ	– генотипические тесты
дАТФ	– дезоксиаденозинтрифосфат
дГТФ	– дезоксигуанозинтрифосфат
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	– дезоксинуклеотидтрифосфат
дТТФ	– дезокситимидинтрифосфат
дЦТФ	– дезоксицитозинтрифосфат
ИБ	– иммунный блотинг
ИЛ	– интерлейкин
ИП	– ингибиторы протеаз
ИППП	– инфекции, передаваемые половым путем
ИФА	– иммуноферментный анализ
ИХЛА	– иммунохемилюминисцентный анализ
кД	– кило-дальтон
МО	– медицинская организация
МГ	– молекулярная гибридизация
МЕ	– международные единицы
м-РНК	– матричная-РНК
НИОТ	– нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы
НК	– нуклеиновая кислота
ННИОТ	– ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы
ОП	– оптическая плотность
ОТ	– обратная транскриптаза
ОФД	– раствор, используемый в ИФА
ПЦР (PCR)	– полимеразная цепная реакция
РНК	– рибонуклеиновая кислота
СП	– санитарные правила
СПИД	– синдром приобретенного иммунодефицита
ТМБ	– тетраметилбензоат, реагент для остановки ИФА
УФО	– ультрафиолетовое облучение
ФГА	– фитогемагглютинин
ФНО (TNF)	– фактор некроза опухоли
ФСБ	– фосфатно-солевой буфер
ЦМВ	– цитомегаловирусная инфекция
ЦПД	– цитопатическое действие вируса

ВВЕДЕНИЕ

В России по данным Федерального научно-методического центра по профилактике и борьбе со СПИДом зарегистрировано на 01.06.2017 г. более 1100000 миллиона чел., инфицированных ВИЧ.

Инфекционный процесс при инфицировании вирусом иммунодефицита человека (далее – ВИЧ) отличается от других вирусных инфекций, где эффективный иммунитет защищает человека в течение определенного периода. Заражение ВИЧ влечет за собой формирование хронической пожизненной инфекции с активным размножением вируса на фоне развития специфического иммунного ответа, что сопровождается разрушением клеток-мишеней и прогрессирующим иммунодефицитом. ВИЧ-инфекция стимулирует как образование антител, так и клеточную иммунную реакцию. ВИЧ является чрезвычайно изменчивым вирусом. Это явление объясняется, прежде всего, тем, что один из его ключевых ферментов – обратная транскриптаза (далее – ОТ) – подвержена мутациям и лишена способности исправлять ошибки. При репликации ВИЧ ежедневно в каждой позиции генома возникают мутации. И, хотя большинство мутантов гибнут, некоторые из них выживают, что является причиной появления устойчивых к антиретровирусным препаратам штаммов. Другим источником формирования генетического разнообразия является процесс рекомбинации, между различными вариантами вируса при коинфекции или суперинфицировании.

Указанные особенности биологии ВИЧ, лавинообразное распространение пандемии потребовали создания точных эффективных, недорогих, высокоспецифичных и чувствительных методов лабораторной диагностики. Для решения этой проблемы были предложены и в настоящее время успешно используется целый ряд методов: иммуноферментный анализ (далее – ИФА), как основной скрининговый метод, и иммуноблот (далее – ИБ), в качестве верификационного и полимеразная цепная реакция (ПЦР). А также молекулярные тесты качественные и количественные, для определения уровня вирусной нагрузки, резистентности ВИЧ к антиретровирусным препаратам.

В пособии изложены особенности биологии ВИЧ, патогенеза ВИЧ-инфекции, подробно описаны методы лабораторной диагностики, интерпретация результатов.

ГЛАВА I ЭТИОЛОГИЯ И ПАТОГЕНЕЗ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

1.1.Этиология ВИЧ-инфекции

1.1.1. Строение ВИЧ.

Вирус иммунодефицита человека (далее – ВИЧ), вызывающий развитие СПИДа, является представителем семейства ретровирусов (*Retroviridae*), подсемейство лентивирусов, к которому также относятся вирусы висны, мэди, инфекционной анемии лошадей, вирусы иммунодефицита обезьян, кошек, крупного рогатого скота. Первые ретровирусы были открыты в начале 20-го века, как этиологические агенты, вызывающие саркомы и лейкозы у птиц. Сидром приобретённого иммунодефицита человека впервые был описан в 1981 году в США. В 1984-1985 году была установлена этиологическая роль вируса иммунодефицита человека. Вирус был выделен двумя группами ученых независимо друг от друга Люк Монтанье (Франция) и Роберт Галло (США)

Типы ВИЧ:

ВИЧ-1 — первый представитель группы, открытый в 1983 году. Является наиболее распространенной формой.

ВИЧ-2 — другой вид вируса иммунодефицита человека, идентифицированный в 1986 году, генетически он очень близок к Т-лимфотропному вирусу макака SIV mac, и в меньшей степени (около 60 %) к вирусу ВИЧ-1. Известно, что ВИЧ-2 менее патогенен и передается с меньшей вероятностью, чем ВИЧ-1. Отмечено, что люди, инфицированные ВИЧ-2, обладают также слабым иммунитетом и к ВИЧ-1.

ВИЧ-3 — редкая разновидность, об открытии которой было сообщено в 1988 году. Обнаруженный вирус не реагировал с антителами других известных групп, а также обладал значительными отличиями в структуре генома. Более распространенное наименование для этой разновидности - ВИЧ-1 подтип О.

Пандемия ВИЧ-инфекции, главным образом, обусловлена распространением ВИЧ-1. ВИЧ-2 распространен преимущественно в Западной Африке.

Вирусологические исследования, проведенные в 50-70 годах 20-го века, заложили основу современного учения о ретровирусах. Особенно значимым было открытие ОТ, необходимой для перевода геномной РНК в дезоксирибонуклеиновую кислоту (далее – ДНК) провируса.

ВИЧ-1 включает в себя 4 основные группы: М, N, О, Р. В группе М, наиболее распространенной, различают 16 подтипов, обозначаемых А, В, С, D и т.д. Другие группы встречаются реже, преимущественно в Африке. ВИЧ-2 включает в себя 10 подтипов и в России регистрируется чрезвычайно редко.

Полноценный ВИЧ имеет сферическую форму с диаметром около 100 нм. В состав зрелой вирусной частицы входят нуклеоид, содержащий вирусную РНК, молекулы ревертазы, интегразы и протеазы, белки с

молекулярной массой 7 кило-дальтон (далее – кД) – gr7 и 24 кД (p24). Между коническим нуклеоидом и наружной оболочкой существует слой матриксного белка, молекулярная масса которого составляет 17 кД. По бокам от нуклеоида имеются два симметричных электронно-плотных образования (так называемые латеральные тельца, или «латеральные концевые повторы») состав и функции которых неизвестны.

Наружная поверхность вириона покрыта оболочечным белком, молекулярная масса которого составляет 120 кД (gr 120). Он соединен нековалентной связью с трансмембранным белком gr 41. Белки gr 120 и gr 41 являются преобладающими белковыми компонентами вируса и играют главную роль в его проникновении вируса в клетки-мишени.

Белок gr 120 формирует на вирусной частице 72 отростка (так называемых, «шипа»). Классически, в структуру каждого шипа входит 3-5 молекул gr 120. В условиях размножения ВИЧ в организме человека этих молекул в шипах гораздо меньше, так как часть их находится в свободном состоянии за счет «слушивания» (этот «свободный» gr 120 имеет существенное значение в патогенезе ВИЧ-инфекции).

Геном ВИЧ. Геном вируса существует в виде *геномной РНК и ДНК-провируса*, состоит из 9749 нуклеотидов и включает в себя **11** *структурных и регуляторных генов: два длинных концевых повтора* (от англ. «long terminal repeat», далее – LTR), *три структурных* (общих для всех ретровирусов) и *шести регуляторных генов*.

В N-концевой части трансмембранного белка gr 41 оболочки ВИЧ содержится пептид слияния (fusion peptide), играющий ключевую роль в процессе слияния оболочки вируса с клеткой-мишенью.

Структурные гены (gag, pol и env) обеспечивают синтез белков вириона:

- гены оболочки (*env*, от англ. «envelope» - «оболочка») кодируют трансляцию белка-предшественника оболочки вируса gp160, в дальнейшем расщепляющегося на gr 120 и gr41.
- группоспецифический ген (*gag*, от англ. «group-specific antigens») кодируют трансляцию белка-предшественника внутренней части вируса (нуклеотида и матрикса) с молекулярным весом 55 кД, расщепляющегося впоследствии на p24, p7, p13, p15, p17/18.
- ген *pol* (от англ. «polymerase») кодирует ферментные системы вируса, обратную транскриптазу с молекулярной массой 66 кД и 51 кД (p66/51), интегразу с молекулярной массой 31 кД (p31/33), рибонуклеазу с молекулярной массой 15 кД (p15). Эти белки выполняют участвуют в синтезе провирусной ДНК из вирусной РНК.

Регуляторные гены кодируют трансактиваторы – белки, обладающие способностью активировать (или тормозить) синтез (функции) структурных и неструктурных генов.

- Ген *tat* (от англ. «transactivator of transcription») кодирует белок с молекулярной массой 14 кД. Он значительно (в тысячу раз) усиливает репликацию вируса, стимулирует активность фактора некроза опухоли

(далее – ФНО, или TNF), способствует реактивации вируса герпеса 8-го типа.

– Ген *rev* (от англ. «regulator of expression of virus proteins») участвует в избирательной активации синтеза структурных белков ВИЧ, замедляет на поздних стадиях синтез регуляторных белков, блокирует экспрессию собственного гена и гена *tat*, участвует в обеспечении транспорта вирусной информационной РНК из ядра в цитоплазму.

– Ген *nef* (от англ. «negative regulatory factor») выполняет функцию замедления транскрипции вирусных генов и обеспечивает на какое-то время состояние равновесия между вирусом и организмом. Белок гена *nef* имеет молекулярную массу 25 кД и локализован, в основном, в цитоплазме и на мембране ядра, способен индуцировать пролиферацию моноцитов периферической крови. ВИЧ лучше реплицируется в клетках, активированных белком гена *nef*.

– Ген *vif* (от англ. «virion infectivity factor») кодирует белок с молекулярной массой 23 кД, который ответственен за эффективное заражение вирусом других клеток, не несущих CD4-структуры (В-клетки, ЦНС). Он усиливает инфекционность ВИЧ: в его отсутствии образуется меньше инфекционных вирионов, чем в его присутствии.

– Ген *vpr* (от англ. «virus protein R») имеется только у ВИЧ-1 и отвечает за синтез белка с молекулярной массой 15 кД, участвует в транскрипции белка на ранних этапах репликации вируса и необходим для инициации LTR.

– Ген *vpu* (от англ. «virus protein U») тоже имеется только у ВИЧ-1. Его функция до конца не расшифрована, вероятно, участвует в выходе вируса из клеток и играет роль в патогенности вирусов.

– Ген *vpx* (от англ. «virus protein X») идентифицирован у ВИЧ-2 (отсутствует у ВИЧ-1). Белок гена имеет молекулярную массу 14 кД, функции его до конца не ясны. Белок LTR выполняет регуляторные функции и необходим для инициации вирусного процесса.

Структура геномов ВИЧ-1 и ВИЧ-2 гомологична на 60 % для генов *gag* и *pol* и на 30-40 % для других генов и LTR. По структурной организации генома ВИЧ-2 ближе к вирусу иммунодефицита обезьян и имеет с ним антигенные перекресты по генам *gag*, *pol* и *env*.

1.1.2. Репликация ВИЧ

Жизненный цикл ВИЧ включает в себя следующие этапы:

- адгезия вируса к рецепторам клетки;
- освобождение вирусной РНК от белков капсида и нуклеокапсида;
- обратная транскрипция вирусной РНК и образование двуцепочечной ДНК-копии вирусного генома;
- транслокация ДНК в ядро клетки и интеграция ДНК в хромосомную ДНК клетки – мишени;

- образование ДНК- провируса;
- транскрипция провирусной ДНК с участием клеточного фермента РНК-полимеразы;
- сплайсинг РНК и транспорт сплайсированной матричной-РНК (далее – м-РНК) из ядра в цитоплазму, синтез вирусных белков;
- транспортировка вирусных белков к внутренним мембранам клетки-мишени, сборка ВИЧ;
- выход вируса из клетки и созревание вирусных частиц с участием протеазы.

Размножение ВИЧ связано с определенными клетками - мишенями, на поверхности которых имеются рецепторы CD4 и хемокиновые рецепторы (CXCR4 и CCR5), играющие доминирующую роль в связывании вириона и индукции конформационных изменений оболочечных вирусных гликопротеидов, необходимых для слияния мембран. В этих процессах имеет значение аффинитет, плотность рецепторов на поверхности клетки. При снижении концентрации рецепторов CD4+ уменьшается чувствительность клетки и инфекционная активность.

После слияния вирусной и клеточной мембран вирусный геном проникает в цитоплазму клетки, затем вся вирусная информация с помощью обратной транскриптазы переписывается с РНК на ДНК, достраивается вторая нить вирусной ДНК. Затем линейная форма двуспиральной ДНК встраивается в ядро клетки-мишени, интегрирует в клеточную ДНК и превращается в *ДНК-провирус*.

Активацию провирусной ДНК могут вызвать вирусы семейства герпеса, вирус гепатита В. Провоцировать активацию провируса, вероятно, могут и другие факторы: бактериальные инфекции, ультрафиолетовое облучение (далее – УФО), гипертермия и т.д.

При активной репликации вируса происходит одновременная наработка всех компонентов вириона, формирование зрелых и дефектных вирусных частиц. Регуляторные и вспомогательные белки экспрессируются раньше структурных, используя в качестве матрицы сплайсированные формы генома. Вспомогательные белки экспрессируются в течение всего жизненного цикла вируса и регулируют многие аспекты его жизнедеятельности, трансформируя обменные процессы в клетке на нужды вируса и способствуя его распространению.

При сборке вирионов часть белка gp 120 остается не включенной в состав вирусов и, впоследствии этот белок может легко связаться с рецептором CD4+ интактного Т-лимфоцита, нарушить его функции и превратить в мишень для цитотоксических клеток.

Перенос вируса осуществляется двумя путями: а) после этапа почкования вируса в межклеточное пространство он захватывается клеткой-реципиентом; б) вирус не выходит из клетки и через сформированные на поверхности клетки-реципиенте нанотрубочки перемещается в цитоплазму клетки (такой способ передачи вируса называется «тропоцитоз»).

1.1.3. Вариабельность и генетические факторы иммунитета к ВИЧ

ВИЧ обладает высокой скоростью генетической изменчивости: одновременно в крови, ликворе, других органах и тканях происходит селективное накопление разных вариантов ВИЧ, отличающихся по нуклеотидной последовательности, антигенным свойствам, цитопатогенному действию (далее – ЦПД).

В организме ВИЧ-инфицированного происходит селекция вариантов в процессе адаптации к хозяину и усиленная репликация вируса в условиях иммунодефицита. Одновременно может наблюдаться циркуляция нескольких вариантов (с преобладанием одного из них). В результате мутаций происходит эволюция подтипов, образование квазивидов и резистентности к антиретровирусным препаратам.

Мутации ВИЧ происходят у любого больного в любое время, независимо от наличия или отсутствия АРВТ. При отмене препаратов резистентные варианты могут исчезать по мере того, как активируется «дикий» вирус. Однако первые могут сохраняться в организме больного в течение длительного времени и, при соответствующих условиях, вновь быстро реплицироваться. Возникновению новых вариантов ВИЧ способствуют точечные мутации на уровне считывания информации с генома РНК на ДНК, затем на уровне возникновения провируса и при транскрипции РНК с ДНК (на уровне провирусов мутации выявляются практически в 100% случаев).

В возникновении множества вариантов ВИЧ важную роль играют также факторы отбора со стороны макроорганизма. Накопленные на сегодняшний день данные свидетельствуют о взаимосвязи между антигеном HLA - B35, высокой активностью Т- супрессоров и генетической предрасположенностью к ВИЧ.

Некоторые люди имеют генетически обусловленную устойчивость к некоторым серотипам ВИЧ, например, лица, гомозиготные по аллелю CCR5-Δ32. Лица, имеющие мутации в CCR5 корецепторах М-тропных штаммов вируса, маловосприимчивы к М-тропным штаммам ВИЧ-1, но заражаются Т-тропными штаммами. Гомозиготность по HLA-Bw4 является предохраняющим фактором от прогрессирования болезни. У гетерозигот по локусам HLA класса I иммунодефицит развивается медленнее, чем у гомозиготных лиц.

У носителей HLA-B14, B27, B51, B57 и C8 инфекция прогрессирует медленнее, а у носителей HLA-A23, B37 и B49 иммунодефицит развивается быстро. У всех ВИЧ-инфицированных с HLA-B35 СПИД развивался не ранее, чем через 8 лет после заражения. У половых партнеров, несовместимых по HLA класса I, риск заражения ВИЧ при гетеросексуальных контактах ниже. Мутация в гене CCR2 также уменьшает шанс проникновения ВИЧ в клетку и приводит к задержке развития СПИД.

Одним из главных элементов антивирусной защиты человека (и других приматов) является белок TRIM5a, способный распознавать капсид вирусных

частиц и препятствовать размножению вируса в клетке. Данный белок обуславливает у человека врожденную устойчивость к вирусу.

Другой важный элемент антивирусной защиты – интерферон-индуцируемый трансмембранный белок CD317/BST-2 (от англ. «bone marrow stromal antigen-2»), способный подавлять выделение вновь образовавшихся дочерних вирионов посредством их удержания на поверхности клетки. Это – трансмембранный белок 2-го типа с необычной топологией. Трансмембранный домен расположен рядом с N-концом, а гликозилфосфатидилинозитол – на С-конце; между ними находится внеклеточный домен. Показано, что CD317 непосредственно взаимодействует со зрелыми дочерними вирионами, «привязывая» их к поверхности клетки.

К ВИЧ фактически устойчивы до 1 % европейцев, еще 10-15 % европейцев имеют частичную устойчивость. Примерно у 10 % всех ВИЧ-положительных лиц, в крови которых присутствует вирус, СПИД не развивается в течение долгого времени.

Высокая степень вариабельности ВИЧ осложняет применение противовирусных препаратов т.к. появляются резистентные формы вируса, иногда этот процесс идет очень быстро. Некоторые варианты вируса в популяции могут уже изначально обладать лекарственной резистентностью.

В Сибирском регионе России в настоящее время наблюдается активное замещение основного генетического варианта - ВИЧ-1 субтипа А, определявшего все предшествующие годы развитие эпидемии ВИЧ-инфекции в стране, новым ВИЧ-1 CRF63_02A1. Проведён сравнительный анализ биологических и генетических свойств ВИЧ-1 из Томской, Кемеровской и Новосибирской областей. Все исследуемые изоляты относились к CRF63_02A1 ВИЧ-1, два из которых были так называемыми, вторичными рекомбинантами, образованными в результате рекомбинации вирусов субтипа А и CRF63_02A1.

1.1.4. Фенотипы и генотипы ВИЧ

Для проникновения вируса внутрь клетки на мембране тропных клеток должны присутствовать рецептор CD4+ и ко-рецепторы. С открытием ко-рецепторов стало ясно, что синцитиеобразующие штаммы используют в качестве основного ко-рецептора CXCR4, а несинцитиеобразующие штаммы – CCR5. Соответственно, согласно новой номенклатуре, фенотип вируса обозначают как R5, X4 или R5X4 (в случае использования обоих ко-рецепторов).

На ранних стадиях инфицирования выделяются, в основном, R5 варианты вируса. По мере развития инфекции происходит смена фенотипа с преобладанием X4 варианта, а партнеру передается лишь CCR5 вариант. Наиболее часто передаваемый вариант R5 размножается преимущественно в активированных CD4+ CCR5+ лимфоцитах и макрофагах. По мере прогрессирования заболевания количество этих клеток уменьшается, и вирус активно инфицирует популяцию CXCR4+Т-клеток. При этом возникают

мутации, происходит смена штаммов с «R5» на «X4» и, в качестве промежуточного варианта, развивается штамм «R5X4».

1.2. Патогенез ВИЧ-инфекции

1.2.1. Клетки мишени и механизмы разрушения клеток.

ВИЧ поражает как клетки, имеющие рецептор CD4+, так и не имеющие его: клетки системы крови (Т4 - лимфоциты, Т8 - лимфоциты, дендритные лимфоциты, моноциты/макрофаги, эозинофилы, мегакариоциты, тимоциты, В-лимфоциты); нервной системы (нейроны, микроглию, астроциты, фибробластоподобные клетки мозга, клетки эндотелия кровеносных сосудов, олигодендроциты); системы пищеварения (клетки эпителия кишечника, М-клетки). Активную репликацию ВИЧ наблюдают в основном в Т-лимфоцитах, дендритных лимфоцитах и тимоцитах.

Важным звеном в патогенезе ВИЧ-инфекции является поражение Т - хелперов, которое обусловлено следующими причинами:

- преждевременным старением и гибелью инфицированных клеток;
- уничтожением зараженных клеток лимфоцитами - эффекторами
- антителзависимой клеточной цитотоксичности;
- блокадой рецепторов CD4+ вирусным гликопротеином gp 120.

На Т-хелперы ВИЧ оказывает прямой цитопатогенный эффект, что приводит к истощению пула клеток, и они не могут обеспечивать взаимодействие с другими иммунокомпетентными клетками. Причиной указанных нарушений является блокада рецепторов CD4+. Взаимодействие поверхностного гликопротеина gp 120 с мембраной CD4 +клеток вызывает не только негативные сигналы, но и приводит к апоптозу зрелых CD4 +клеток лимфоцитов или CD34+ гемопоэтических клеток-предшественников даже при отсутствии инфицирования клеток ВИЧ.

В Т-лимфоцитах уже в первые три часа после инфицирования наблюдается увеличение синтеза и ядерной транслокации белков теплового шока, что свидетельствует о способности белка gp 120 запускать каскад процессов направленных на формирование клеточной стресс-реакции. На терминальной стадии ВИЧ-инфекции происходит разрушение архитектуры лимфоузлов и увеличение количества ВИЧ. Установлено, что ВИЧ может сохраняться в Т-лимфоцитах в латентном состоянии и может репродуцироваться при активации клеток.

В моноцитах не происходит активной репликации ВИЧ. В макрофагах ВИЧ реплицируется с умеренной интенсивностью, поэтому они не подвергаются цитолизу при выходе вирионов из клеток, но претерпевают значительные ультраструктурные изменения, что приводит к ослаблению их функциональной активности. Массовое заражение макрофагов происходит на 14 день инфицирования. Инфицированные макрофаги могут существовать длительное время и, перейдя в латентное состояние, формируют резервуары ВИЧ.

В-лимфоциты имеют невысокую плотность CD4+ рецепторов, поэтому они повреждаются вирусом в меньшей степени. Косвенным подтверждением является гипергаммаглобулинемия за счет Ig G и Ig A, но отмечена диспропорция уровней подклассов IgG: содержание Ig G1 и Ig G3 увеличено, тогда как концентрация Ig G2 и Ig G4 значительно уменьшена. В-лимфоциты на фоне активной секреции антител имеют слабую реакцию на митогены. Так как функционирование В-клеток контролируется Т-лимфоцитами, то в целом дисфункция В-лимфоцитов является вторичной по отношению к дисфункции Т-клеток.

Под воздействием вируса происходит изменение спектра цитокинов. Наблюдается гиперэкспрессия ИЛ-6, ФНО, ИЛ-10, гамма-интерферона и уменьшение синтеза ИЛ-2, ИЛ-4. Таким образом, через цитокиновое звено ВИЧ нарушает кооперативные связи иммунокомпетентных клеток и вызывает структурно-функциональные изменения иммунной системы в целом.

Поражение ВИЧ ЦНС связано с аномальной активацией цитокиновых рецепторов, что приводит к морфологическим нарушениям клеток. Механизм неврологических расстройств ассоциирован с разрушением синаптических связей, которое влечет за собой дисрегуляцию высокоинтегрированной системы, вплоть до когнитивных расстройств, наиболее распространенной формой которой является СПИД-деменция. Особенно чувствительными являются нейроны в базальных ганглиях и лобной коре. Именно здесь степень инфицированности достигает наибольшей величины.

В качестве основного резервуара хранения вируса, где ВИЧ может сохраняться годами выступают CD4+ Т-клетки памяти; кроме того, вирус также длительно персистирует в макрофагах, дендритных лимфоцитах, микроглиальных клетках мозга, нормальных киллерах.

После заражения ВИЧ вирус разносится макрофагами лимфогенным путем по организму и уже на 1-5 сутки от момента заражения определяется в крови. С этого времени инфицированный ВИЧ человек становится заразным для окружающих. Вирус активно размножается в крови и вскоре отмечается максимальный пик виремии.

В среднем через 10-14 дней от заражения (у некоторых пациентов – через 3–4 недели, а в отдельных случаях – через период до 6 месяцев) организм в ответ на внедрение вируса развивает специфический иммунный ответ, и в крови появляются антитела к ВИЧ. Антитела нейтрализуют большую часть вирусов, и виремия резко снижается. Период от появления виремии до появления специфических антител называется **«серологическим окном»**. В этот период у человека наблюдается высокая степень инфицированности, а диагностировать у него ВИЧ можно только с помощью тестов, определяющих антигены или нуклеиновую кислоту ВИЧ (т.к. количество антител невелико и они не выявляются).

В период максимальной виремии у ВИЧ-инфицированного пациента могут появиться клинические проявления острой ВИЧ-инфекции (острый ретровирусный синдром), чаще в виде гриппоподобного или мононуклеозоподобного синдромов.

После снижения вiremии и исчезновения симптомов острой ВИЧ-инфекции наступает обычно длительная бессимптомная стадия. Клинических симптомов ВИЧ-инфекции нет или они минимальны (например, лимфаденопатия). Вместе с тем, в организме ежедневно образуются миллиарды новых вирусов, и иммунная система напряженно работает, удаляя их. Вiremия в этот период минимальна (вплоть до неопределяемой), может незначительно повышаться на фоне общего ослабления организма (например, во время острой респираторной инфекции или вакцинации), но затем снова снижается. Количество CD4+ лимфоцитов в крови длительное время остается в пределах нормальных значений.

Через годы клинической латенции наступает момент срыва компенсаторного механизма, и количество вируса в крови растет. Неконтролируемое поражение вирусами Т-хелперов в конечном итоге приводит к снижению количества CD4+ лимфоцитов в плазме крови – развитию Т-клеточного иммунодефицита. Появляются клинические проявления иммунодефицита, то есть наступают симптомные стадии ВИЧ инфекции. Определение момента начала прогрессирования ВИЧ-инфекции (по клиническим и иммунологическим критериям) важно для своевременного старта лечения АРТ.

Положительная динамика обусловлена увеличением числа цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов. Эти лимфоциты способны уничтожать ВИЧ-инфицированные клетки напрямую путём цитолиза без ограничения по человеческому лейкоцитарному антигену класса I (*Human leukocyte antigen-HLA*).

Кроме того, они секретируют подавляющие факторы (хемокины), такие как RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta MDC, препятствующие размножению вируса путём блокировки корецепторов.

ВИЧ-специфичные CD8+ лимфоциты играют главную роль в контроле острой фазы ВИЧ-инфекции, однако при хроническом течении инфекции пролиферация и активация лимфоцитов CD8+ зависит от антиген-специфичных Т-хелперов CD4, а лимфоциты CD8+ также могут заражаться ВИЧ, что может вести к снижению их числа.

Синдром приобретённого иммунодефицита развивается у большинства больных при падении числа CD4+ Т-лимфоцитов крови ниже 200 клеток/мл (норма CD4+ Т-лимфоцитов 1200 клеток/мл).

- Под влиянием вируса изменяются:
- мембраны CD4+ Т-лимфоцитов, что ведёт их к слиянию между собой с образованием гигантских синцитиев.
- Активируются клетки-киллеры.
- Возникает аутоиммунная катастрофа.
- Происходит связывание свободного белка вируса gp120 с CD4-рецептором (маскировка CD4-рецептора) и как результат — гибель неинфицированных Т-лимфоцитов.
- Усиливается апоптоз.

В-лимфоциты при ВИЧ-инфекции подвергаются поликлональной активации и выделяют большое количество иммуноглобулинов, ФНО α , интерлейкин-6 и лектин DC-SIGN, которые способствуют проникновению ВИЧ в Т-лимфоциты.

Кроме того, наблюдается значительное снижение интерлейкина-2, вырабатываемого CD4-хелперами 1 типа и имеющего критическое значение в активации цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+, CTL) и подавление вирусом секреции макрофагами интерлейкина-12 — ключевого цитокина в образовании и активации Т-хелперов 1 типа и NK-лимфоцитов (от англ. «natural killer cells»).

Одной из ключевых особенностей ВИЧ является высокая степень генетической изменчивости. Изменчивость в самой вариабельной части генома, кодирующей гликопротеин оболочки вирусной частицы, даже у одного больного может составлять 15%, а различия между вирусами, выделенными в разных регионах, достигают подчас 40%- 50%.

Белок gp 120 способствует образованию многоядерных клеток - синцитиев, в состав которых входят как зараженные, так и незараженные клетки с маркером CD4+. Эти клетки быстро теряют свою жизнеспособность, их количество уменьшается, что и приводит к возникновению иммунодефицита. Симпластообразование является важным компонентом в патогенезе ВИЧ-инфекции.

Способность вируса образовывать синцитии тесно связана с его вирулентностью: высокосинцитиеобразующие штаммы чаще выделяются от больных с прогрессирующей ВИЧ-инфекцией и на стадии пре-СПИДа.

Ген env имеет как высококонсервативные, так и высокоизменчивые участки. Петля V3 гликопротеина gp 120 определяет тропизм к лимфоцитам или макрофагам, взаимодействует с ко-рецепторами и является мишенью для нейтрализующих антител.

1.2.2. Устойчивость ВИЧ

Значительное количество вируса обнаруживается в крови, сперме, грудном молоке, вагинальном секрете, ликворе, в остальных же биологических жидкостях вируса в 10-100 раз меньше. В крови, предназначенной для переливания, вирус может сохраняться годы, а в замороженной сыворотке 10 лет. В замороженной сперме ВИЧ сохраняется несколько месяцев.

В высушенном препарате инфицированных лимфоидных клеток при комнатной температуре вирус погибает через 3 суток; при высушивании бесклеточной жидкости в присутствии плазмы – через 7 дней при температуре +23-27°C, при повышении температуры до +56°C - через 5 часов. В жидкой среде при температуре +23-27° С он сохранит активность в течение 15 дней, повышение температуры до +37° С приводит к его гибели через 11 дней.

Прогревание инфицированной крови, или ее компонентов, при температуре +60°C. в течение 30 часов не всегда полностью убивает вирус: в его поврежденных оболочечных белках может сохраниться инфекционный

потенциал и при попадании даже дефектного вируса в организм происходит репликация ВИЧ.

Глава II. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

Диагностика ВИЧ-инфекции включает в себя два этапа: установление собственно факта зараженности ВИЧ-инфекцией и определение стадии заболевания.

Тесты для лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции подразделяют на диагностические и тесты для наблюдения за течением заболевания:

1. Диагностические тесты, применяемые в России:

- Скрининговые - для определения антигена и антител к ВИЧ (иммуноферментный анализ, простые быстрые тесты).
- Подтверждающие - для определения антител к индивидуальным белкам ВИЧ (иммунный блотинг).
- Для обнаружения ДНК ВИЧ (ПЦР: качественный вариант).

2. Тесты для наблюдения за течением заболевания:

- Определение РНК ВИЧ (ПЦР, количественный вариант).
- Определение иммунного статуса - исследование CD4-лимфоцитов.
- Исследование лекарственной резистентности.

Мониторинг ВИЧ-инфицированных, состоящих на диспансерном учете, включает в себя также общеклинические, гематологические и биохимические тесты.

2.1. Иммунохимические методы диагностики (ИФА, ИБ)

2.1.1. Требования, предъявляемые к забору материала для исследования методом ИФА.

Исследованию подлежат сыворотки, не содержащие примеси эритроцитов, бактериальной контаминации, хилеза, гемолиза. При наличии любого из указанных признаков сыворотки уничтожаются и назначается повторный забор крови.

Для обеспечения качественной лабораторной диагностики необходимо обеспечить тщательное выполнение правил преаналитической подготовки. Наиболее оптимальным является использование одноразовых вакуумных систем для взятия крови, исключающих заражение медицинского персонала и повышающих сохранность проб. Особое внимание необходимо уделять тщательной маркировке пробирок и заполнению направлений, чтобы

исключить подмену проб и канцелярские ошибки. Зачеркивать, вносить изменения или поправки в направление категорически запрещается.

Если взятие крови произведено в поликлинике, то пробирку с кровью немедленно доставляют в лабораторию. Если для проведения исследования необходимо получить сыворотку, кровь центрифугируют. После центрифугирования отделяют сыворотку от сгустка и клеток крови и помещают в холодильник при $+4$ $+8^{\circ}\text{C}$ или замораживают при -20°C . Сыворотка крови стабильна при $+2$ $+8^{\circ}\text{C}$ в течение 5-7 суток. При необходимости более длительного хранения ее необходимо хранить от -20°C . Транспортировка осуществляется в специальных контейнерах, биксах, сумках-холодильниках.

2.1.2. Принцип ИФА

Наиболее доступным, распространенным и дешевым методом диагностики ВИЧ-инфекции является иммуноферментный анализ (ИФА). Для исследования используют сыворотку крови, ликвор, мочу, генитальный секрет, слезную жидкость, дуоденальную жидкость, слюну.

Метод удобен для выполнения большого числа однотипных исследований: в ИФА на первом этапе происходит образование комплекса антиген-антитело, который затем проявляется с помощью фермент-субстратной реакции.

Ферменты должны быть стабильны, легко определяться с помощью цветной, флюоресцентной или хемилюминисцентной метки. В ИФА достаточно часто используют пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, D-галактозидазу, ацетилхолинэстеразу, глюкозооксидазу. В цветных реакциях бесцветное вещество (хромоген) под действием фермента или продукта ферментативной реакции превращается в окрашенное соединение (хромофор), что и позволяет затем проводить детекцию результатов. Результаты регистрируют с помощью многоканального спектрофотометра и проводят сравнение с контрольными образцами.

В диагностике инфекционных болезней используют гетерогенный твердофазный ИФА, где реакция между антигеном и антителом происходит на границе раздела двух фаз: жидкой и твердой. Один из компонентов иммобилизован на твердом носителе, другой вносится в виде водного раствора. Образующиеся иммунные комплексы связываются с твердой фазой, а непрореагировавшие компоненты остаются в растворе и удаляются с помощью промывок.

Разработано несколько модификаций твердофазного гетерогенного ИФА: прямой, непрямой, «сэндвич» метод и метод двойного «сэндвича». Прямой метод представлен двумя модификациями: конкурентным и неконкурентным. Конкурентный метод используется для определения низкомолекулярных антигенов из исследуемой жидкости. Неконкурентный – для определения антигенов в фиксированных образцах клеток, тканей, на нитроцеллюлозных фильтрах, а также антигенов подвергнутых электрофорезу

и перенесенные с геля на нитроцеллюлозную мембрану (иммуноблот, вестернблот). Метод имеет существенный недостаток: не всегда можно получить активный конъюгат. Этих недостатков лишен непрямой метод ИФА.

Непрямой метод происходит в две стадии: на первой происходит образование комплекса АГ-АТ, который проявляют с помощью конъюгата (меченые ферментом антивидовые антитела, против первых антител). Данный метод используется как для определения антигенов, так и для определения антител. При определении антител можно определять как суммарные иммуноглобулины, так и отдельные классы М и G.

«Сэндвич»-метод широко используется для выявления поливалентных антигенов. Принцип метода: иммобилизованные антитела взаимодействуют с антигеном из пробы, на втором этапе с антигеном связываются меченые антитела, специфичные к другой или другим антигенным детерминантам. «Сэндвич» метод используется также для определения иммуноглобулинов, относящихся к одному классу. Недостаток метода - неприемлим для определения небольших антигенов с одной антигенной детерминантой.

В качестве твердой фазы в ИФА используют различные полимерные материалы: полистирол, поливинил, полиамид, полипропилен, а также сахарозу, желатин, пористые мембраны из нитроцеллюлозы.

Твердая фаза может иметь форму планшетов, пробирок, шариков. Чувствительность анализа определяется природой твердой фазы и гидрофобностью специфического реагента. В большинстве применяемых тест-систем в производственных условиях иммобилизуют антигены трех типов: лизаты ВИЧ- инфицированных клеток, рекомбинантные белки вирионов, синтетические белки ВИЧ. Антигены должны быть максимально очищены, т.к. специфичность тест-систем, в первую очередь, зависит от чистоты иммобилизованного белка.

Лизатные тест-системы относятся к тестам первого поколения, с их помощью выявляются все присутствующие антитела, но они обладают гиперчувствительностью и дают большое количество ложноположительных результатов.

В рекомбинантных тест-системах используют белки ВИЧ, полученные в прокариотах, за счет встраивания отдельных генов ВИЧ, отвечающих за синтез диагностически значимых белков. Обычно, в рекомбинантных тест-системах используют два-три белка ВИЧ, например: GP 120, GP 41, Р 24. Эти тест-системы более специфичны, чем лизатные, но менее чувствительны.

Сверхчувствительные тест-системы 4-го поколения содержат комплекс лизатных, рекомбинантных, пептитных антигенов для определения антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, ВИЧ-1 группа 0 и антигена ВИЧ-1 p24, что позволяет сократить период "серонегативного окна" до 2-х недель и повысить безопасность при переливании крови. Так как ВИЧ обладает высочайшей степенью изменчивости, это накладывает отпечаток на результаты, полученные в ИФА и ИБ, поскольку антитела могут не выявляться в силу отсутствия комплементарности между иммобилизованным антигеном,

имеющим определенную структуру и антителами, свойства которых варьируют от штамма к штамму, от пациента к пациенту.

Гетерогенный твердофазный ИФА является высокочувствительным методом, дает возможность определять соединения с различным молекулярным весом. Высокая специфичность метода позволяет дифференцировать АТ к различным возбудителям.

Качество иммуноферментных тест-систем оценивается по ряду показателей, главными из них являются чувствительности и специфичность. Чувствительность – это то минимальное количество определяемого вещества, которое выявляется с помощью данной тест-системы в опытном образце. Специфичность – это способность к тонкой иммунологической дифференциации данной тест-системы. Благодаря своей высокой чувствительности (более 99,5%) ИФА вошел в ряд наиболее популярных методов лабораторной диагностики различных заболеваний человека.

В ИФА проводится качественная оценка результатов, которые регистрируются с помощью мультисканов в виде показателей оптической плотности относительно порогового значения (вычисляется на основе контрольных образцов) и предполагает выдачу двух вариантов ответа: результат положительный или отрицательный.

Антитела к ВИЧ появляются у 90-95 % зараженных в течение 3-х месяцев после заражения, у 5-9 % - через 6 месяцев от момента заражения, и у 0,5-1 % - в более поздние сроки. Наиболее ранний срок обнаружения антител - 2 недели от момента заражения.

2.1.3. Алгоритм диагностики ВИЧ-инфекции

Стандартным методом лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции служит определение антител/антигенов к ВИЧ с помощью ИФА. Для подтверждения результатов в отношении ВИЧ применяются подтверждающие тесты (иммуноблот) и в сомнительных случаях ПЦР (Постановление от 21.07.16. № 95) .

Лабораторная диагностика ВИЧ-инфекции основана на выявлении антител к ВИЧ и вирусных антигенов, а также, в особых случаях, выявлении провирусной ДНК ВИЧ и вирусной РНК ВИЧ (у детей первого года жизни и лиц, находящихся в инкубационном периоде).

Лабораторные исследования по диагностике ВИЧ-инфекции осуществляются в учреждениях государственной, муниципальной или частной системы здравоохранения на основании санитарно-эпидемиологического заключения и лицензии, предоставляемой в порядке, установленном законодательством Российской Федерации.

Стандартным методом лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции служит одновременное определение антител к ВИЧ 1,2 и антигена р25/24 ВИЧ с помощью диагностических тестов ИФА и ИХЛА, разрешенных к

применению в Российской Федерации в установленном порядке. Для подтверждения результатов в отношении ВИЧ применяются подтверждающие тесты (иммунный, линейный блот). У детей первого года жизни и лиц, находящихся в инкубационном периоде, для подтверждения диагноза и своевременного назначения АРТ может быть использовано определение РНК или ДНК ВИЧ молекулярно-биологическими методами.

Диагностический алгоритм тестирования на наличие антител к ВИЧ состоит из двух этапов - скрининга и подтверждения результатов скринингового исследования.

На первом этапе (скрининг).

Если получен положительный результат в ИФА или ИХЛА, 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, сыворотка считается первично-положительной и направляется в референс - лабораторию для дальнейшего исследования.

На втором этапе (подтверждение результатов скринингового исследования в референс-лаборатории).

Первично положительная сыворотка повторно исследуется в ИФА или ИХЛА во второй тест-системе другого производителя, отличающейся от первой по составу антигенов, антител или формату тестов. При получении отрицательного результата сыворотка повторно исследуется в третьей тест-системе, отличающейся от первой и второй по составу антигенов, антител или формату тестов. Используемые вторая и третья тест-системы должны иметь аналогичные и более высокие аналитические характеристики (чувствительность, специфичность) по сравнению со скрининговой тест-системой. В случае получения отрицательного результата (во второй и третьей тест-системах) выдается заключение об отсутствии антител/антигенов ВИЧ. При получении положительного результата (во второй и/или третьей тест-системе) сыворотку необходимо исследовать в иммунном или линейном блоте. Результаты, полученные в подтверждающем тесте, интерпретируются как положительные, неопределенные и отрицательные.

В целях обеспечения контроля и учета исследований референс-диагностика должна осуществляться в том же субъекте Российской Федерации, где проводилось скрининговое обследование в лаборатории уполномоченной специализированной медицинской организации, осуществляющей организационно-методическую работу по проведению диагностических, лечебных, профилактических и противоэпидемических мероприятий по ВИЧ-инфекции и сопутствующим заболеваниям.

Референс-диагностика может проводиться также в ФБУН, на базе которых функционируют федеральный и окружные центры по профилактике и борьбе со СПИД, и в ФКУ Республиканская клиническая инфекционная больница (г.Санкт-Петербург).

Положительными (позитивными) считаются пробы, в которых обнаруживаются антитела как минимум к 2 из 3 гликопротеинов ВИЧ (env). Пациент с положительным результатом исследования в иммунном или линейном блоте направляется к врачу-инфекционисту уполномоченной специализированной медицинской организации, осуществляющей организационно-методическую работу по проведению диагностических, лечебных, профилактических и противоэпидемических мероприятий по ВИЧ-инфекции для клинического осмотра, сбора анамнеза, установления диагноза ВИЧ-инфекции.

Отрицательными (негативными) считаются сыворотки, в которых не обнаруживаются антитела ни к одному из антигенов (белков) ВИЧ.

Неопределенными (сомнительными) считаются сыворотки с белковым профилем в иммунном блоте, не отвечающим критериям позитивности. При получении неопределенного результата с белковым профилем, включающим белки сердцевин (gag) p25/p24, проводится исследование для диагностики ВИЧ-2.

При получении отрицательного и сомнительного результата в иммунном или линейном блоте рекомендуется исследовать биологический образец в тест-системе для определения p25/24 антигена или ДНК/РНК ВИЧ.

При получении отрицательного или неопределенного результата в подтверждающем тесте и выявлении антигена p25/24 или выявлении ДНК/РНК ВИЧ пациент направляется к врачу-инфекционисту уполномоченной специализированной медицинской организации, осуществляющей организационно-методическую работу по проведению диагностических, лечебных, профилактических и противоэпидемических мероприятий по ВИЧ-инфекции для клинического осмотра, сбора анамнеза, установления диагноза ВИЧ-инфекции или (если исследование не проводилось ранее) забора крови для определения РНК/ДНК ВИЧ молекулярно-биологическими методами.

Если получены отрицательные результаты при определении ДНК/РНК ВИЧ, то проводятся повторные исследования на антитела/антигены к ВИЧ через 3 месяца. Если через 3 месяца после первого обследования вновь будут получены неопределенные результаты в ИБ, ИФА или ИХЛА, а у пациента не будут выявлены факторы риска заражения, ДНК/РНК ВИЧ и клинические симптомы ВИЧ-инфекции, результат расценивается как ложноположительный. (При наличии эпидемиологических и клинических

показаний серологические исследования проводятся повторно по назначению лечащего врача или эпидемиолога).

В особых случаях (у лиц, находящихся в инкубационном периоде), когда диагноз ВИЧ-инфекции поставлен на основании клинических и лабораторных показателей (выявление ДНК/РНК ВИЧ), следует провести повторное исследование на наличие антител к ВИЧ в иммунном или линейном блоте через 6 месяцев, а при получении пациентом антиретровирусной терапии - через 12 месяцев.

При получении положительных результатов в 2-х тест-системах на этапе подтверждения результатов скрининга и отрицательных результатов в иммунном блоте и тесте для определения антигена р25/24 необходимо повторить исследование через 2 недели.

Исключить проведение повторных обследований методом иммунного блота у лиц с установленным ранее диагнозом "ВИЧ-инфекция".

Принять меры по обеспечению сохранности сывороток ВИЧ-инфицированных в течение не менее одного года с момента постановки диагноза.

2.1.4. Причины ложных результатов в ИФА

Причиной ложноотрицательного результата является ситуация, когда количество антител в исследуемой сыворотке ниже чувствительности тест-систем. Это чаще наблюдается в начальном и терминальном стадиях ВИЧ-инфекции, когда количество антител невелико, а возможности всех известных тест-систем ограничены. Второй причиной ложно-негативного результата является вариабельность ВИЧ.

Ложноположительные результаты отмечаются при использовании практически всех существующих тест-систем, поэтому положительный результат в ИФА, полученный в одной тест-системе, не является заключением о ВИЧ-позитивности пациента, его необходимо подтвердить в более специфическом тесте, которым является иммуноблот, или более чувствительном – ПЦР.

Получение ложных результатов зависит от многих факторов и условий:

а) технических погрешностей, связанных с конструированием и транспортировкой тест-систем;

б) забора материала, доставки и постановки ИФА;

в) от наличия сопутствующих заболеваний (туберкулез, ревматизм, сифилис, опухоли, аутоиммунные заболевания, ожоги, заболевания печени, недифференцированные ретровирусные заболевания, малярия, лейшманиоз);

г) регистрируется ложнопозитивность у беременных, доноров и реципиентов крови, лиц находящихся на гемодиализе, у свежепривитых.

Антитела появляются у большинства ВИЧ-инфицированных через три - шесть месяцев после инфицирования, причем чаще это антитела к белкам gp 160, gp 120, p24, p17, а затем через две-четыре недели появляются антитела к

белкам gr 41, p65 и через шесть недель – к p31. Если получены отрицательные результаты в ИФА, то дальнейшее исследование не требуется.

2.1.5. Иммуноблот (ИБ).

ИБ – метод являющийся верификационным и позволяющим дать заключение об истинной позитивности, сомнительном результате или ложной серопозитивности. ИБ также относится к иммунохимическим методам, но, в отличие от ИФА, при его постановке выявляют не сумму антител, а спектр антител к белкам ВИЧ. Название "иммунный блотинг" или «иммуноблот» в модификации Western Blot переводится «blot», скорее всего, как ««клякса», а «western» - как «западная» отражает направление распространения этой «кляксы» по бумаге слева направо.

Принцип метода состоит в том, что в специализированных производственных условиях выращивают ВИЧ *in vitro*, вирусную массу многократно очищают от примесей и дезинтегрируют вирус. Затем фракционируют вирусные компоненты в полиакриламидном геле и переносят электрофорезом разделенные белки ВИЧ на нитроцеллюлозную мембрану, которую нарезают на полоски шириной 5 мм, именуемые стрипы. В диагностических лабораториях стрип с известными вирусными антигенами помещают в планшет, заливают исследуемой сывороткой, а полученные комплексы АГ-АТ проявляют с помощью иммунохимической реакции, аналогичной ИФА. Учет результатов визуальный: по наличию или отсутствию полос. Качество ИБ зависит от степени очистки от клеточных белков и дезинтеграции вируса.

В сыворотке лиц инфицированных ВИЧ-1 обнаруживают антитела к следующим белкам: оболочки (env) - gp160, gp120, gp41; ядра (gag) - p17, p24, p55, а также ферментов вируса (pol) - p31, p51. При инфицировании ВИЧ-2 у пациентов определяются антитела к env - gp140, gp105, gp36; gag - p6, p25, p56; pol - p68.

Результаты, полученные в ИБ, интерпретируются как положительные, сомнительные и отрицательные. Согласно рекомендациям ВОЗ *положительными* считаются сыворотки, в которых обнаружены антитела к двум белкам гена env в сочетании или без реакции с другими белкам (gag, pol). При наличии взаимодействия с одним из белков оболочки в сочетании с другими белками реакция считается сомнительной и рекомендуется повторное тестирование с использованием набора другой серии или другой фирмы. Если и после этого результат остается сомнительным, то рекомендуется исследование в течение 6 месяцев (2 недели, 3 мес., 6 мес.). ИБ является менее чувствительным, чем ИФА и нередко дает результаты, которые трудно интерпретировать (Таб.1).

Ложноположительные результаты определения антител к ВИЧ в ИБ являются казуистикой (частота встречаемости 0,0004-0,0007%). Они могут быть обусловлены появлением аутоантител, обнаружением поствакцинальных антител (у пациентов, участвующих в клинических испытаниях вакцин против ВИЧ), а также возможностью технической или канцелярской ошибки.

Таблица 1.

Интерпретация результатов иммунного блотинга

Интерпретация	Всемирная Организация Здравоохранения	Консорциум по стандартизации исследования ретровирусов	Российский центр по профилактике и борьбе со СПИДом
Положительный результат	2 ENV ± GAG ± POL	1 ENV + (1GAG или 1POL)	1 ENV± GAG ± POL
Неопределенный результат	1 ENV ± GAG ± POL или GAG + POL или GAG или POL	GAG + POL или GAG или POL или ENV	GAG + POL или GAG или POL
Отрицательный результат	Полосы отсутствуют Нет специфических полос	Полосы отсутствуют Нет специфических полос	Полосы отсутствуют Нет специфических полос

Ложноположительный результат можно заподозрить, если у пациента отсутствуют факторы риска инфицирования ВИЧ, не определяется ДНК/РНК, вирусный антиген и показатели количества CD4 лимфоцитов в пределах нормы..

2.1.6. Особенности диагностики ВИЧ-инфекции у детей.

Для диагностики ВИЧ-инфекции у детей в возрасте до 18 месяцев, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями, в связи с наличием материнских антител, применяются иные подходы:

- используют методы, направленные на выявление генетического материала ВИЧ (ДНК или РНК). Метод выявления ДНК ВИЧ является предпочтительным. При наличии высокого риска заражения ВИЧ исследование проводится в первые 48 часов жизни ребенка (нельзя исследовать кровь из пуповины) и в возрасте 14-21 дня. Первое обязательное исследование на ДНК/РНК ВИЧ проводится через 2 недели после окончания курса АРТ. При получении положительного результата второе исследование проводится в кратчайшие сроки. При получении отрицательного результата второе обязательное исследование проводится в возрасте 4-6 месяцев. Получение положительных результатов обследования на ДНК ВИЧ или РНК ВИЧ в двух отдельно взятых образцах крови у ребенка в любом возрасте является лабораторным подтверждением диагноза ВИЧ-инфекции. Получение двух отрицательных результатов обследования на ДНК ВИЧ или РНК ВИЧ в возрасте 1,5-2 месяцев и 4-6 месяцев (при отсутствии грудного вскармливания) свидетельствует против наличия у ребенка ВИЧ-инфекции, однако снятие ребенка с диспансерного учета по поводу интранатального и

перинатального контакта по ВИЧ-инфекции может производиться в возрасте старше 6 месяцев.

Снятие с диспансерного учета по перинатальному контакту по ВИЧ-инфекции в возрасте старше 6 месяцев проводится по решению врачебной комиссии при одновременном наличии следующих условий:

- два и более отрицательных результата исследования на антитела к ВИЧ методом ИФА или ИХЛА;
- отсутствие выраженной гипогаммаглобулинемии на момент исследования крови на антитела к ВИЧ;
- два и более отрицательных результата исследования ДНК или РНК ВИЧ в возрасте 1,5-2 месяцев и старше 4 месяцев;
- ребенок не прикладывался к груди ВИЧ-инфицированной женщины;
- отсутствие клинических проявлений ВИЧ-инфекции.

Ребенок, получавший грудное вскармливание от ВИЧ-инфицированной женщины, должен быть обследован на ДНК/РНК ВИЧ после его полного прекращения: через 4-6 недель, 3 месяца и 6 месяцев. Ребенок, получавший грудное вскармливание, может быть снят с диспансерного учета при отсутствии ДНК или РНК ВИЧ и получении как минимум двух отрицательных результатов исследования на антитела к ВИЧ (с интервалом не менее 1 месяца), проведенных минимум через 6 месяцев после полного прекращения грудного вскармливания.

Диагностика ВИЧ-инфекции у детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями и достигших возраста 18 месяцев, осуществляется так же, как у взрослых.

Лабораторная диагностика ВИЧ-инфекции может осуществляться только при использовании сертифицированных стандартизованных диагностических тест-систем (наборов), разрешенных к использованию на территории Российской Федерации в установленном порядке.

В целях проведения входного контроля качества используемых тест-систем для выявления лиц, инфицированных вирусом иммунодефицита человека, применяются стандартные панели сывороток (отраслевые стандартные образцы), разрешенные к использованию в установленном порядке.

В заключении об отсутствии или наличии антител к ВИЧ 1,2 и антигена ВИЧ, выдаваемом лабораторией по результатам ИФА, ИХЛА, ИБ, указывается наименование тест-системы, срок ее годности, серия, результат ИФА или ИХЛА (положительный, отрицательный), результат иммунного, линейного блота (перечень выявленных белков и заключение: положительный, отрицательный, неопределенный). При конфиденциальном исследовании документ должен содержать паспортные данные: полные Ф.И.О., полную дату рождения, адрес места жительства, код контингента.

При анонимном обследовании документ маркируется специально установленным кодом.

2.1.7. Экспресс-тесты.

В настоящее время наблюдается тенденция снижения стоимости медицинского обслуживания. В связи с этим наибольшую популярность приобретают простые методы анализа не требующие дорогого оборудования. В модифицированных вариантах ИФА для адсорбции различных антигенов вместо внутренних поверхностей лунок микротитровальных планшетов, используют нитроцеллюлозные фильтры в виде полосок. Преципитирующие хромогенные субстраты, обычно применяемые в ИБ, на белом фильтре образуют легко различимые цветные пятна, в результате чего отпадает нужда в дорогих мультисканах. Простота и экономичность в отношении расхода антигенов и реагентов позволяют применять экспресс - тесты за пределами лаборатории, в экстренных, полевых и домашних условиях. Их применяют для диагностики как вирусных, так и бактериальных инфекций.

В качестве исследуемого материала может использоваться кровь, сыворотка, плазма крови и слюна.

Области применения быстрых тестов.

- вертикальная профилактика - тестирование беременных женщин с неизвестным ВИЧ-статусом в предродовом периоде (для назначения медикаментозной профилактики ВИЧ-инфекции в родах);
- постконтактная профилактика ВИЧ - тестирование на ВИЧ в случае аварийной ситуации;
- скрининговое обследование на ВИЧ-инфекцию в случае проведения профилактических и противоэпидемических мероприятий на выездных или мобильных пунктах добровольного консультирования и тестирования на ВИЧ в местах организованного или массового пребывания представителей целевых групп населения;
- проведение экспресс-оценки распространенности ВИЧ-инфекции в целевых группах населения при осуществлении дозорного эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией.

Каждое исследование на ВИЧ с применением простых/быстрых тестов должно сопровождаться обязательным параллельным исследованием той же порции крови стандартными методами ИФА, ИХЛА, ИБ или направлением пациента на обследование стандартными методами. Выявление положительных результатов простых/быстрых тестов при обследовании на ВИЧ-инфекцию во время проведения выездных профилактических мероприятий по ВИЧ-инфекции должно сопровождаться обязательным направлением пациента в Центр по профилактике и борьбе со СПИД или уполномоченную медицинскую организацию. В случае получения отрицательного результата тестирования на ВИЧ при обследовании в рамках выездных профилактических мероприятий направление на обследование

стандартными методами выдается по желанию пациента.

Выдача заключения о наличии или отсутствии ВИЧ-инфекции только по результатам простого/быстрого теста не допускается. Результаты простых/быстрых тестов используются только для своевременного принятия решений в экстренных ситуациях, при массовом добровольном исследовании населения, и при экспресс - оценке эпидемиологической ситуации в целевых группах населения при осуществлении дозорного эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией.

Технические ошибки, возникающие при постановке быстрых тестов: неправильное дозирование исследуемого материала, одновременное проведение исследования нескольких образцов (больше двух) приводит к неточности соблюдения сроков инкубации разных этапов; использование гемолизированной сыворотки; проведения исследований лицами, не прошедших предварительный инструктаж; использование сыворотки, плазмы без центрифугирования (эритроциты в исследуемом образце).

Чувствительность и специфичность быстрых тестов составляют 99-100%, то есть – сопоставимы с результатами ИФА. Отрицательный результат тестирования свидетельствует об отсутствии антител к ВИЧ и не нуждается в подтверждении другими тестами. При получении неопределенного результата тестирование следует провести повторно через месяц.

Ложноотрицательный результат при экспресс - диагностике может быть следствием следующих причин: низкий уровень антител в образце (ранняя стадия сероконверсии), который ниже предела чувствительности теста; инфицирование пациента мутантным вирусом, чувствительность к которому в тест-системе невелика; неправильное хранение образцов крови.

2.1.8. Порядок освидетельствования на ВИЧ-инфекцию.

Основным методом выявления ВИЧ-инфекции является проведение тестирования на антитела к ВИЧ и антиген p25/24 с обязательным до- и послетестовым консультированием. Присутствие антител к ВИЧ, РНК или ДНК ВИЧ является лабораторным доказательством наличия ВИЧ-инфекции.

Отрицательный результат тестирования на антитела к ВИЧ не является абсолютным подтверждением отсутствия заболевания. В течение нескольких месяцев после заражения ВИЧ (обычно в первые 3 месяца), результат тестирования может быть ложноотрицательным. Период между заражением и появлением антител к ВИЧ называют "серонегативным окном".

Освидетельствование на ВИЧ-инфекцию проводится добровольно, за исключением случаев, когда такое освидетельствование является обязательным.

Обязательному медицинскому освидетельствованию на ВИЧ-инфекцию подлежат контингенты населения, указанные в

постановлении № 95, 2016 г.: «Контингенты, подлежащие обязательному медицинскому освидетельствованию на ВИЧ-инфекцию и рекомендуемые для добровольного обследования на ВИЧ-инфекцию».

В регионах Российской Федерации с генерализованной стадией эпидемии ВИЧ-инфекции (более 1% ВИЧ-инфицированных среди беременных женщин) рекомендуется привлекать к добровольному тестированию на ВИЧ лиц в возрасте 18-60 лет, обратившихся за медицинской помощью, а также при прохождении диспансеризации.

По желанию освидетельствуемого лица добровольное тестирование на ВИЧ может быть анонимным.

Медицинские работники должны рекомендовать лицам, относящимся к контингентам повышенного риска заражения ВИЧ-инфекцией, регулярно проходить освидетельствование на ВИЧ-инфекцию для раннего выявления ВИЧ-инфекции, консультирования по вопросам ВИЧ-инфекции и своевременного начала лечения в случае заражения.

Освидетельствование на ВИЧ-инфекцию (в том числе и анонимное) осуществляется в медицинских организациях всех форм собственности, получивших в установленном порядке лицензию, с информированного согласия пациента в условиях строгой конфиденциальности, а в случае обследования несовершеннолетних в возрасте до 14 лет - по просьбе или с согласия его законного представителя, несовершеннолетнего в возрасте до 18 лет, а также лица, признанного в установленном законом порядке недееспособным, - в порядке, установленном законодательством Российской Федерации.

Освидетельствование на ВИЧ-инфекцию проводится с обязательным до - и послетестовым консультированием по вопросам профилактики ВИЧ-инфекции. Факт проведения консультирования фиксируется в медицинской документации.

Консультирование должно проводиться обученным специалистом (желательно врачом-инфекционистом, врачом-эпидемиологом, психологом) и включать основные положения, касающиеся тестирования на ВИЧ, возможные последствия тестирования, определение наличия или отсутствия индивидуальных факторов риска, предоставление информации о путях передачи ВИЧ и способах защиты от заражения ВИЧ, видов помощи, доступных для инфицированного ВИЧ. Консультирование представителей уязвимых групп населения может проводиться обученным равным консультантом. Допускается как индивидуальное, так и групповое дотестовое консультирование.

При проведении дотестового консультирования необходимо в двух экземплярах заполнить форму информированного согласия на проведение освидетельствования на ВИЧ-инфекцию, одна форма выдается на руки обследуемому, другая сохраняется в медицинской организации.

Направление на исследование в иммуноферментном анализе образца крови на ВИЧ-инфекцию заполняется всеми медицинскими организациями

независимо от организационно-правовой формы и формы собственности, имеющими разрешение на данный вид деятельности.

При конфиденциальном тестировании персональные данные на пациента приводятся без сокращений (по паспорту или заменяющему его документу, удостоверяющему личность обследуемого): полные Ф.И.О., полная дата рождения, гражданство, адрес места жительства, код контингента.

При анонимном тестировании (без паспорта) указывается только цифровой код, включающий порядковый номер освидетельствуемого, год рождения, место жительства (субъект Российской Федерации). Фамилия, имя, отчество освидетельствуемого не указываются.

Ответ о результате освидетельствования выдается при завершении алгоритма тестирования. Выдача официального документа о наличии или об отсутствии ВИЧ-инфекции у освидетельствуемого лица осуществляется только учреждениями государственной или муниципальной системы здравоохранения в виде лабораторного заключения (справка, сертификат). Результаты тестирования на ВИЧ освидетельствуемому сообщает специалист в ходе послетестового консультирования; по возможности один и тот же специалист проводит до - и послетестовое консультирование пациента.

Консультирование при любом результате тестирования на ВИЧ должно содержать обсуждение значения полученного результата с учетом риска заражения ВИЧ для освидетельствуемого; разъяснение путей передачи ВИЧ и способов защиты от заражения ВИЧ для освидетельствуемого; видов помощи, доступных для инфицированного ВИЧ, и рекомендации по дальнейшей тактике тестирования.

Консультирование при неопределенном результате тестирования на ВИЧ в дополнение к комплексу стандартной информации должно содержать обсуждение возможности инфицирования ВИЧ, необходимости соблюдения мер предосторожности с целью исключения распространения ВИЧ-инфекции, гарантий оказания медицинской помощи, лечения, соблюдения прав и свобод ВИЧ-инфицированных. Тестируемый направляется в Центр по профилактике и борьбе со СПИД или уполномоченную медицинскую организацию.

Лицо, у которого выявлена ВИЧ-инфекция, уведомляется специалистом о результатах тестирования. Специалист сообщает положительный результат теста в ясной и краткой форме, предоставляет время для восприятия этого известия, отвечает на вопросы обследуемого. Разъясняет необходимость соблюдения мер предосторожности с целью исключения распространения ВИЧ-инфекции, о гарантиях оказания медицинской помощи, лечения, соблюдения прав и свобод ВИЧ-инфицированных, а также об уголовной ответственности за поставление в опасность заражения, либо заражение другого лица. Тестируемый направляется для установления диагноза ВИЧ-инфекции, оказания медицинской помощи в Центр по профилактике и борьбе со СПИД

или уполномоченную медицинскую организацию с обязательной подачей информации в территориальный Центр по профилактике и борьбе со СПИД в письменном виде.

Результаты исследования по телефону, электронной почте, путем СМС- информирования не сообщаются.

Обязательному медицинскому освидетельствованию на ВИЧ-инфекцию подлежат:

- Доноры крови, плазмы крови, спермы и других биологических жидкостей, тканей и органов (в т.ч. спермы), а также беременные в случае забора абортной и плацентарной крови для производства биологических препаратов при каждом взятии донорского материала;

Обязательному медицинскому освидетельствованию для выявления ВИЧ-инфекции при поступлении на работу и при периодических медицинских осмотрах подлежат следующие работники:

- Врачи, средний и младший медицинский персонал центров по профилактике и борьбе со СПИДом, учреждений здравоохранения, специализированных отделений и структурных подразделений учреждений здравоохранения, занятые непосредственным обследованием, диагностикой, лечением, обслуживанием, а также проведением судебно-медицинской экспертизы и другой работы с лицами, инфицированными вирусом иммунодефицита человека, имеющие с ними непосредственный контакт;

- Врачи, средний и младший медицинский персонал лабораторий (группы персонала лабораторий), которые осуществляют обследование населения на ВИЧ-инфекцию и исследование крови и биологических материалов, полученных от лиц, инфицированных вирусом иммунодефицита человека;

- Научные работники, специалисты, служащие и рабочие научно-исследовательских учреждений, предприятий (производств) по изготовлению медицинских иммунобиологических препаратов и других организаций, работа которых связана с материалами, содержащими вирус иммунодефицита человека.

- Медицинские работники в стационарах (отделениях) хирургического профиля при поступлении на работу и в дальнейшем 1 раз в год;

- Лица, проходящие военную службу и поступающие в военные учебные заведения и на военную службу по призыву и контракту, при призыве на срочную военную службу, при поступлении на службу по контракту, при поступлении в военные ВУЗы министерств и ведомств, устанавливающих ограничения для приема на службу лиц с ВИЧ-инфекцией;

- Иностранные граждане и лица без гражданства при обращении за получением разрешения на гражданство или видом на жительство, или разрешением на работу в Российской Федерации, при въезде на территорию Российской Федерации иностранных граждан на срок более 3-х месяцев.

По желанию освидетельствуемого лица добровольное тестирование на ВИЧ может быть анонимным.

2.1.9. Алгоритм диагностики донорской крови.

Доноры крови, компонентов крови, органов и тканей (в том числе спермы) допускаются к взятию донорского материала после изучения документов и результатов медицинского обследования, подтверждающих возможность донорства и его безопасность для медицинского применения.

При проведении мероприятий по пропаганде донорства плазмы крови необходимо проводить разъяснения о необходимости повторного обследования донора через 6 месяцев после донации.

Безопасность донорской крови, ее компонентов, донорских органов и тканей подтверждается отрицательными результатами лабораторного исследования образцов крови доноров, взятых во время каждого забора донорского материала, на наличие возбудителей гемотрансмиссивных инфекций, в том числе ВИЧ, с использованием иммунологических и молекулярно-биологических методов.

Отбор образцов донорской крови для определения маркеров гемотрансмиссивных инфекций производится во время процедуры донации крови и компонентов крови непосредственно из системы с кровью (без нарушения целостности системы) или специального контейнера-спутника для проб, имеющегося в составе этой системы, в вакуумсодержащие (вакуумобразующие) одноразовые пробирки, соответствующие применяемым методикам исследований. При заборе органов и тканей (в том числе спермы) отбор образцов крови доноров для определения маркеров гемотрансмиссивных инфекций производится параллельно процедуре забора донорского материала (при каждой сдаче донорского материала).

При исследовании образца крови донора проводится одновременное определение наличия антител к ВИЧ-1, 2 и антигена ВИЧ p24/25. Первое иммунологическое исследование (ИФА, ИХЛА) проводится в единичной постановке. При получении положительного результата анализа соответствующее исследование (ИФА, ИХЛА) повторяется два раза с использованием реагентов, применяемых при первой постановке. В случае получения хотя бы одного положительного результата при повторном тестировании на маркеры ВИЧ донорский материал признается непригодным для клинического использования, образец направляют на референс-исследование.

Запрещается для повторного анализа сероположительных образцов крови использовать тест-системы с меньшей чувствительностью и специфичностью, а также тест-системы или методы предыдущего поколения по сравнению с тест-системами, которые использовались в первичном анализе.

Молекулярно-биологические исследования (ПЦР, NAT) проводятся параллельно с обязательными иммунологическими исследованиями (ИФА, ИХЛА) на маркеры вируса иммунодефицита человека, вируса гепатита В,

вируса гепатита С в соответствии с требованиями нормативной документации.

Молекулярно-биологическое исследование может проводиться в единичной постановке или мини-пуле, размер которого определяется инструкцией производителя реагентов или оборудования, на котором проводится исследование, утвержденной в установленном порядке.

В случае тестирования индивидуальных образцов, при получении положительного результата анализа соответствующее исследование повторяется два раза с использованием реагентов, применяемых при первой постановке. В случае получения хотя бы одного положительного результата при повторном тестировании образец донорской крови признается положительным, донорский материал признается непригодным для клинического использования.

В случае получения положительного результата для мини-пула соответствующее исследование повторяется два раза в единичной постановке для всех образцов плазмы, входящих в данный мини-пул.

Донорскую плазму передают в медицинские организации для трансфузий после повторного (не менее чем через 6 месяцев) обследования донора на наличие маркеров вирусов ВИЧ-1, 2 и других гемотрансмиссивных инфекций для исключения возможности невыявления инфицирования в период серонегативного окна (карантин). Карантинизация свежезамороженной плазмы осуществляется на срок не менее 180 суток с момента замораживания при температуре ниже минус 25°C. По истечении срока карантинизации свежезамороженной плазмы проводится повторное обследование состояния здоровья донора и лабораторное исследование крови донора с целью исключения наличия в ней маркеров и (или) возбудителей гемотрансмиссивных инфекций.

В случае неявки донора для повторного обследования по истечении 180 суток плазма может быть пригодна для клинического использования только при условии применения технологии инаktivации (редукции) патогенных биологических агентов и молекулярно-биологических исследований крови донора на маркеры и (или) возбудители гемотрансмиссивных инфекций.

Допускается проведение инаktivации (редукции) патогенных биологических агентов плазмы для клинического использования до окончания срока карантина при условии молекулярно-биологического исследования крови донора на маркеры и (или) возбудители гемотрансмиссивных инфекций.

Компоненты крови с малым сроком годности (до 60 дней) следует заготавливать от доноров, сообщивших об отсутствии факторов риска заражения ВИЧ, и использовать в период срока годности. Их безопасность должна обязательно подтверждаться молекулярно-биологическими исследованиями.

В качестве дополнительной меры, повышающей вирусную безопасность крови и ее компонентов, не заменяя их, допускается применение методов инаktivации патогенных биологических агентов.

Не соответствующие требованиям безопасности или неиспользованные донорская кровь и ее компоненты изолируются и подвергаются утилизации, включающей обеззараживание дезинфицирующими растворами или применение физических методов дезинфекции с помощью оборудования, разрешенного для этих целей в установленном порядке, а также удаление образовавшихся отходов.

Допускается передача донорской крови или ее компонентов, не соответствующих требованиям безопасности или неиспользованных, разработчикам (научно-исследовательским организациям соответствующего профиля) и (или) производителям диагностических препаратов.

Данные о донорах крови и ее компонентов, процедурах и операциях, выполняемых на этапах заготовки, переработки, хранения и использования донорской крови и ее компонентов, а также о результатах исследования донорской крови и ее компонентов регистрируются на бумажном и (или) электронном носителях. Регистрационные данные хранятся в течение 30 лет и должны быть доступны для проверки со стороны контролирующих органов.

При получении положительного результата исследования на ВИЧ у донора крови организация, осуществляющая заготовку и переработку крови, оперативно проводит анализ предыдущих случаев донаций за период не менее 12 месяцев, предшествующих последней донации, и выбраковывает донорскую кровь и ее компоненты, полученные от этого донора.

При получении организацией, осуществляющей заготовку и переработку крови, информации о возможном заражении реципиента гемотрансмиссивными инфекциями необходимо установить донора (доноров), от которого могло произойти заражение, и принять меры для предотвращения использования донорской крови или ее компонентов, полученных от этого донора (доноров).

Организация, осуществляющая заготовку и переработку крови, в течение 24 часов осуществляет отзыв продуктов крови, подозрительных на наличие возбудителей инфекций, и направляет в территориальный Центр СПИД и органы, осуществляющие государственный санитарно-эпидемиологический надзор, донесение с указанием полной информации о возможных рисках инфицирования реципиента от ВИЧ-положительного донора крови, сведения о возрасте, адресе места жительства для вызова и обследования реципиентов.

В случае получения информации о возможном заражении реципиента гемотрансмиссивными инфекциями проводится анализ предыдущих случаев донации за период не менее 12 месяцев, предшествующих последней донации, повторно анализируется документация, а организация, осуществляющая переработку крови (плазмы), оценивает необходимость

отзыва изготовленных продуктов крови, принимая во внимание вид заболевания, интервал времени между донацией и исследованием крови и характеристику продукта. Отозванные продукты крови, (продукты крови, полученные от предыдущих донаций за период 12 месяцев, предшествующий донации, повлекшей заражение ВИЧ реципиента), изолируются и передаются для исследования в Центр по профилактике и борьбе со СПИД или уполномоченную медицинскую организацию.

Запрещается переливание донорской крови и ее компонентов, пересадка органов и тканей и искусственное оплодотворение от доноров, не обследованных на наличие возбудителей гемотрансмиссивных инфекций, в том числе ВИЧ, с использованием иммунологических и молекулярно-биологических методов.

Врач, назначающий гемотрансфузии компонентов крови, пересадку органов и тканей и искусственное оплодотворение, должен разъяснить больному или его родственникам существование потенциального риска передачи вирусных инфекций, включая ВИЧ.

Запрещается переливание крови и ее компонентов из одного полимерного контейнера более чем одному реципиенту.

В случае переливания донорской крови, ее компонентов, пересадки донорских органов и тканей от инфицированного ВИЧ донора как можно ранее (но не позднее 72 часов после переливания/пересадки) необходимо провести постконтактную химиопрофилактику заражения ВИЧ антиретровирусными препаратами.

2.2. Молекулярно-генетические тесты

Создание методов амплификации специфических последовательностей нуклеиновой кислоты вируса, осуществляемой в результате повторных циклов ДНК-синтеза (ПЦР), открыло новые возможности в области детекции нуклеиновых кислот (НК). Современные методы амплификации НК имеют различные модификации: полимеразная цепная реакция, лигазная цепная реакция, цикличная зондовая технология, NASBA- метод и др. При амплификации концентрация специфических геномных последовательностей увеличивается в миллионы раз, что позволяет выявить конечный продукт доступными методами.

2.2.1. Забор и хранение материала для иммунологических и молекулярно-генетических исследований.

Для проведения молекулярных тестов используют разнообразный клинический материал: кровь, сыворотку крови, форменные элементы крови, мочу, слюну, соскобы и мазки со слизистых, ликвор, слезную жидкость, содержимое везикул, биоптаты органов и тканей. Для исключения контаминации забор проб производят только одноразовым инструментарием

(шприцы, соответствующие зонды, пробоотборники и пр.). Взятый материал помещают в одноразовые пробирки, при постановке реакции используют автоматические микропипетки со сменными одноразовыми наконечниками. При заборе крови необходимо тщательное перемешивание крови с ЭДТА, для предотвращения формирования сгустка: иначе выделение НК станет невозможным.

Забранный материал хранят при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не дольше 24 часов; для более точного исследования следует отделить плазму в течение 4-х часов. При длительном хранении (до 1 месяца) используют низкие температуры (-70°C). В некоторых тест-системах допускается хранение плазмы при $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение 5 дней. Цельная кровь хранится при $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение 48 часов. Необходимо минимизировать время от забора образца до постановки ПЦР. Для амплификации не требуется сохранения инфекционности вируса, что важно при работе с особо опасными возбудителями.

Оптимально, когда забор крови происходит непосредственно рядом с лабораторией, которая будет выполнять исследования, поскольку длительность и условия хранения и транспортировки материала могут повлиять на результат. Длительность и условия хранения наиболее лимитированы при исследовании образцов крови на количество CD4+ лимфоцитов и вирусную нагрузку.

Хранить кровь для определения количества CD4+ лимфоцитов допустимо до 4 часов при комнатной температуре, поскольку при более длительном хранении или при хранении при более низкой температуре происходит разрушение клеток крови, и результат теста будет искусственно занижен (2).

Имеется методика пересчета результатов теста с использованием поправочных коэффициентов на «старение крови» при ее хранении, но все же более достоверный результат будет получен при постановке теста в те сроки от забора крови, которые оговорены инструкцией. Клетки крови могут быть также разрушены при неаккуратном перемешивании и небрежной транспортировке.

Хранить цельную кровь для определения вирусной нагрузки можно также недолго – до 6 часов при температуре холодильника, поскольку содержащиеся в плазме человека РНК - азы будут постепенно разрушать РНК ВИЧ, и вирусная нагрузка при длительном хранении крови будет снижаться. При необходимости более длительного хранения следует произвести центрифугирование крови, отделить плазму и заморозить ее.

Кровь, забранную для качественного определения ВИЧ (ДНК ПЦР), не следует замораживать, поскольку будут разрушены лимфоциты, в которых и находится интегрированная ДНК ВИЧ. При необходимости длительного хранения крови следует отцентрифугировать ее, отделить лимфоциты и заморозить их.

Таблица 2.

Подготовка крови для исследования вирусологических и иммунологических показателей при ВИЧ-инфекции

Исследование	объем крови	антикоагулянт	подготовка пробы	хранение и транспортировка
Количество CD4 лимфоцитов	3-5 мл	ЭДТА	перемешать** и закрыть	до 4 часов при комнатной t° (не в холодильнике!)
Качественное определение ВИЧ	1-2 мл	ЭДТА *	перемешать** и закрыть	до 4 суток при $+2+8^{\circ}\text{C}$ (не замораживать!)
Вирусная нагрузка или определение лекарственной резистентности	2-3 мл	ЭДТА *	перемешать и закрыть	до 6 ч при $+2+8^{\circ}\text{C}$
			выделить плазму – центрифугирование со скоростью 80-100 оборотов/мин в течение 20 мин	до 1 суток при $+2+8^{\circ}\text{C}$, при заморозке: -20°C – 1 месяц -80°C – 6 месяцев

* нельзя добавлять гепарин и цитрат натрия, так как они ингибируют ПЦР

** перемешивание необходимо для недопущения образования сгустка, но оно должно быть аккуратным, чтобы не привести к разрушению клеток крови.

Транспортировка образцов осуществляется в сумках-холодильниках, термоконтейнерах, термосах с термопакетами, льдом или сухим льдом.

2.2.2. Принцип ПЦР

Молекулярно-генетические методы являются высокочувствительными (помогают выявить 1-5 копий возбудителя в пробе) и специфичными, позволяют поставить диагноз в течение 6-8 часов, а в режиме реального времени (real-time PCR) – 2-х часов. Перспективны при необходимости ранней диагностики ВИЧ до появления в сыворотке АТ, при неясных серологических результатах, при определении наличия ВИЧ в организме новорожденных детей от инфицированных женщин, целесообразно использовать эти методы при обследовании серонегативных сексуальных партнеров инфицированных лиц.

Механизм этих реакций заключается в том, что имеются определенные олигонуклеотиды: высококонсервативные и высокоспецифичные последовательности нуклеотидов из искомым геномов. В реакции молекулярной гибридизации такие нуклеотиды называют зондами, в полимеразной цепной реакции – праймерами. При постановке реакции

молекулярной гибридизации назначение зонда – найти в исследуемом материале комплементарные последовательности и сформировать структуры между парами азотистых оснований. При этом не происходит увеличения копий возбудителя, поэтому МГ является менее чувствительным методом по сравнению с ПЦР.

Метод ПЦР разработан в 1983 г. К.Мюллисом (K.Mullis) и основан на достройке ферментом Tag-полимеразой праймеров, присоединенных к денатурированной матрице. Праймеры определяют специфичность реакции и величину копируемого фрагмента – это искусственно синтезированные олигонуклеотиды, идентичные соответствующим участкам ДНК-мишени. Они играют ключевую роль в образовании продуктов реакции амплификации. Правильно подобранные праймеры обеспечивают специфичность и чувствительность тест-системы.

Taq-полимераза – термостабильный фермент, обеспечивающий достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности, выделен из термофильных бактерий *Thermus aquaticus* и проявляет активность при температуре +72° С.

Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) – дезоксиаденозинтрифосфата (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфата (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфата (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфата (дТТФ) – это «строительный материал», используемый Taq-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК.

Буфер – смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающих оптимальные условия для реакции и стабильное значение pH.

Анализируемый образец – подготовленный к внесению в реакционную смесь образец, который может содержать искомую ДНК, служащую мишенью для последующего многократного копирования. При отсутствии ДНК-мишени специфический продукт амплификации не образуется.

Каждый цикл ПЦР состоит из трех этапов: а) **денатурация** исследуемой нуклеиновой кислоты при +94° С; б) **отжиг**, во время которого праймеры связываются с участками ДНК, при этом температура понижается до +55-65° С; в) **комплементарное достраивание** последовательности ДНК, температура 72° С.

После каждого цикла число молекул матрицы удваивается, в результате происходит экспоненциальная амплификация фрагмента ДНК-матрицы (рис. 1). Это позволяет в течение двух часов за 25-40 циклов накопить ПЦР продукт в количестве, достаточным для детекции. В результате амплификации концентрация специфических геномных последовательностей возрастает в миллион и более раз.

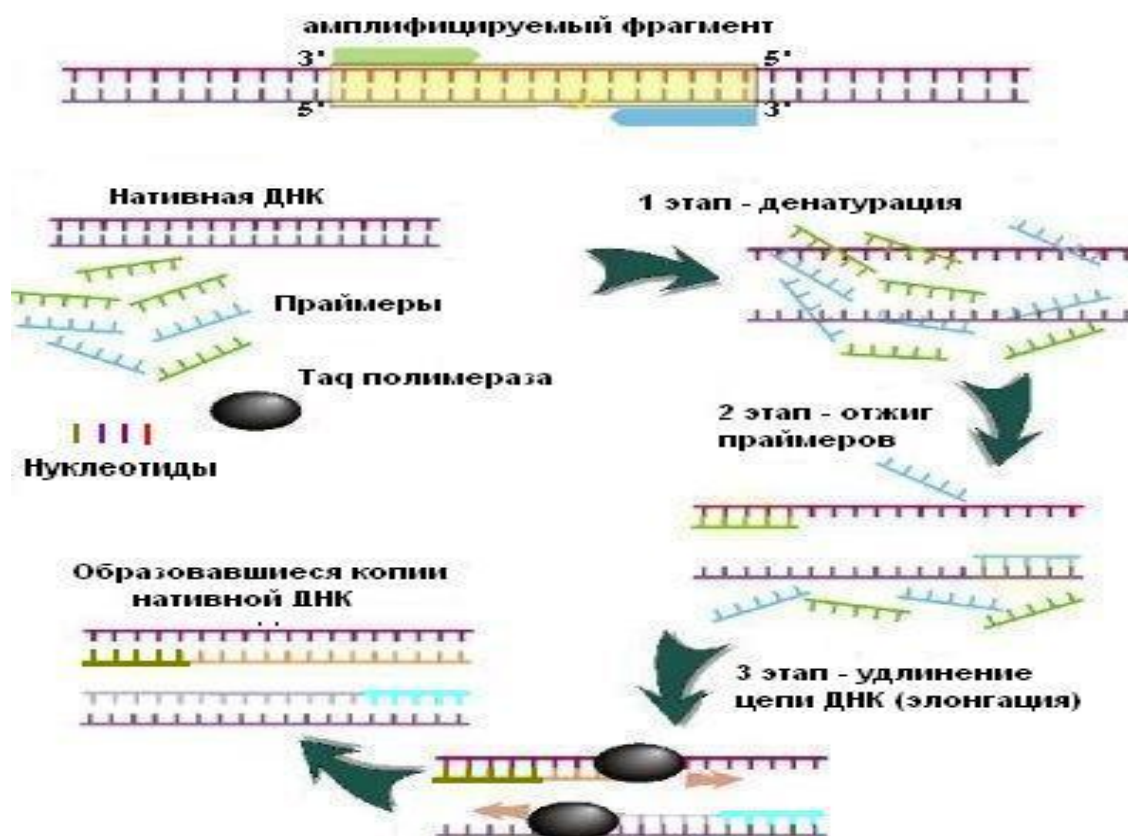


Рисунок 1 . Схема цикла полимеразной цепной реакции.

2.2.3. Методика постановки ПЦР

ПЦР-анализ состоит из трех стадий:

А) Подготовка биологического материала.

Для подготовки пробы к постановке ПЦР используют различные методики в зависимости от поставленных задач. Их суть заключается в экстракции (извлечении) ДНК или РНК из биопрепарата и удалении или нейтрализации посторонних примесей для получения препарата ДНК или РНК с чистотой, пригодной для постановки реакции амплификации.

Б) Амплификация (собственно ПЦР).

Для проведения реакции амплификации необходимо приготовить реакционную смесь и внести в нее анализируемый образец ДНК.

Если мишенью служит РНК (например, определение вирусной нагрузки ВИЧ, гепатит С), необходимо в первую очередь перевести ее в форму ДНК. Для этого перед ПЦР проводят реакцию обратной транскрипции, используя фермент обратную транскриптазу. Для проведения реакции обратной транскрипции в реакционной смеси так же, как и в ПЦР, должны присутствовать праймеры и смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов. После

проведения реакции обратной транскрипции полученные молекулы ДНК могут служить мишенью для проведения ПЦР.

В) Детекция.

Существует несколько методов детекции продуктов ПЦР. Ранее использовались методы электрофореза, но они не дают возможности проводить количественную оценку результатов и создают риск контаминации лаборатории, в результате которой возможно получение ложноположительных результатов. В настоящее время этот метод используется редко.

Другой способ детекции продуктов амплификации основан на гибридизации олигонуклеотидных зондов (искусственно синтезированных участков ДНК) с продуктами амплификации, содержащими ту или иную метку, детектируемую специальными приборами. В этом случае используют систему детекции, аналогичную используемой в ИФА. Этот метод позволяет получать количественные результаты. Такой метод оценки результатов применяется, например, в тест-системах фирмы Roche с автоматизированной детекцией на анализаторах Cobas Amplicor. Однако и этот способ детекции в настоящее время вытесняется так называемой Real-Time ПЦР.

Метод real-Time ПЦР позволяет получать количественный результат в широком линейном диапазоне и исключает риск контаминации продуктами амплификации. В реакционную смесь вводят гибридизационные зонды, в состав которых входят нуклеотиды, меченные особыми реактивами – флуорофором и гасителем. Флуорофоры способны излучать энергию лишь в свободном от гасителя состоянии. На стадии отжига происходит гибридизация зондов с внутренними участками ампликонов. В процессе элонгации Таq-полимераза разрушает зонды за счет своей экзонуклеазной активности. Это приводит к попаданию меченых нуклеотидов в раствор, где они начинают флуоресцировать. Интенсивность флуоресценции фиксируется специальным детектором и пропорциональна количеству продуктов амплификации. Если гибридизация не проходит (искомая ДНК отсутствует в образце), то зонд остается целым, а флуорофоры, входящие в его состав, не дают излучения.

РНК-тест (ВН) применяется, главным образом, для мониторинга эффективности применения антиретровирусных препаратов, а также как точка отсчета начала терапии. ДНК-тест имеет высокую чувствительность (1-10 копий/мл.), и его используют для раннего выявления ВИЧ у детей, рожденных от ВИЧ-инфицированных матерей, в случае сомнительного блота, для выявления ВИЧ в период серонегативного окна.

Таким образом, в диагностике ВИЧ-инфекции используют молекулярные тесты направленные на выявление ДНК - ВИЧ (качественный тест), РНК-ВИЧ (количественный тест), определение резистентности ВИЧ при неэффективной терапии.

2.2.4. Вирусная нагрузка.

Прямое количественное определение РНК ВИЧ в плазме имеет ведущее значение среди всех маркеров прогрессирования болезни и используется для первичной оценки состояния пациента, контроля эффективности антивирусного лечения, а также при обследовании ВИЧ-инфицированных беременных женщин за 4 недели до предполагаемых родов.

Для оценки эффективности и безопасности АРТ в рамках диспансерного наблюдения проводятся регулярные исследования вирусной нагрузки, уровня CD4+ лимфоцитов, клинические и биохимические исследования крови, инструментальные и клинические исследования. Основным критерием эффективности АРТ является снижение вирусной нагрузки до неопределяемого уровня (С.П. 3.1.5.2826-10).

Показания для проведения определения РНК ВИЧ:

1. Первичная диагностика ВИЧ-инфекции, если результат иммуноблота неопределенный
2. Первичная оценка стадии выявленной ВИЧ-инфекции
3. Перед началом антиретровирусной терапии
4. Беременные ВИЧ-инфицированные женщины за 4 недели до предполагаемых родов.
5. ВИЧ-инфицированные лица, состоящие на диспансерном учете (в том числе получающие ВАРТ) обследуются согласно стандартам.

Концентрация РНК ВИЧ измеряется в количестве копий РНК ВИЧ в миллилитре крови или в десятичных логарифмах (\log_{10}) на миллилитр крови.

Скорость плазматического клиренса и продолжительность жизни инфицированных клеток не зависят от ВН, величина ВН свидетельствует о среднем количестве вируса вне их. Прогрессия заболевания зависит от устойчивого равновесия между продукцией вируса и разрушением инфицированных клеток, выражающаяся в постоянном уровне концентрации вируса в крови. При одинаковом количестве CD4+ клеток лица с большей ВН погибают раньше, чем с меньшей ВН. Как правило, повышение содержания РНК ВИЧ в плазме коррелирует с увеличением концентраций собственно вируса и ДНК-провируса и со снижением числа клеток CD4+.

Продолжительность проведения анализа при использовании систем разных производителей отличается, что определяется в значительной степени уровнем автоматизации процесса исследования.

При проведении мониторинга вирусной нагрузки у пациента рекомендуется выполнять исследования в одной и той же лаборатории одним и тем же методом, хотя в целом тест-системы разных производителей показывают сходные результаты.

Вирусную нагрузку следует измерять на фоне стабильного клинического состояния, не ранее чем через 4 недели после вакцинации или перенесенной инфекции.

Большинство применяемых в клинической практике тест-систем позволяют определять нагрузку от 50 копий/мл (по современным

представлениям, именно такая минимальная чувствительность методики необходима для оценки динамики вирусной нагрузки в процессе лечения).

После начала терапии может наблюдаться быстрое снижение уровня РНК ВИЧ в течение 1–4 недель, отражающее действие лекарственных препаратов на ВИЧ – как на свободные вирионы в плазме, так и на ВИЧ в первично инфицированных лимфоцитах CD4+. Далее следует второе снижение вирусной нагрузки, оно более длительное (месяцы), менее выраженное и отражает эффективность противовирусного действия препаратов на зараженные ВИЧ макрофаги и ВИЧ, высвобождающийся из других резервуаров, особенно дендритных клеток лимфатических фолликулов, которые захватывают ВИЧ. Максимальный противовирусный эффект ожидается через 4–6 месяцев.

Таким образом, в случае выбора эффективной антиретровирусной терапии следует ожидать снижения ВН на 1,5–2,0 log копий/мл через 4 недели до уровня менее 500 копий/мл через 8–16 недель и до уровня менее 50 копий/мл через 24–48 недель.

Вирусную нагрузку следует определять каждые 3–4 месяца во время лечения, чтобы убедиться, что она сохраняется на уровне ниже 50 копий/мл. При уровне вирусной нагрузки менее 50 копий/мл не происходит формирования резистентных штаммов вируса — это наиболее важный аргумент в пользу необходимости поддержания вирусной нагрузки на этом уровне в течение как можно более длительного времени. С практической точки зрения на этом уровне не происходит активной репликации вируса и вероятность возникновения резистентности очень невелика.

Небольшие подъемы вирусной нагрузки от неопределяемого уровня до 50–200 копий/мл могут наблюдаться и без развития устойчивых штаммов вируса. Единичные «всплески» вирусной нагрузки допустимы, однако постоянный уровень вирусной нагрузки выше 50 копий/мл свидетельствует о вирусологической неудаче терапии. Постоянный уровень вирусной нагрузки более 50 копий/мл указывает на репликацию вируса и, следовательно, на возможность присутствия в его геноме мутаций резистентности.

Вирусная нагрузка у мужчин на фоне сохранного иммунитета может быть несколько выше, чем у женщин (до 2 раз), но при снижении количества CD4+лимфоцитов (<300 клеток/мкл) эти различия исчезают. Поэтому при оценке уровня вирусной нагрузки при принятии решения о начале АРТ пол пациента не учитывают.

Клиническая трактовка результатов определения вирусной нагрузки сложна, так как:

- возможны естественные колебания ВН в условиях полного благополучия;
- транзитное повышение уровня ВН могут вызвать появление острого эпизода оппортунистической инфекции или вакцинация;
- определяемый уровень вирусной нагрузки в крови может не отражать уровень вирусной нагрузки в других тканях.

Динамика вирусной нагрузки у детей, инфицированных перинатально, отличается от таковой у ВИЧ-инфицированных взрослых. В первую очередь, у детей дольше сохраняются высокий уровень виремии. У детей с низким уровнем ВИЧ РНК при рождении ($< 10\,000$ копий/мл) наблюдается его резкое возрастание к 2 месяцам жизни. У большинства новорожденных с высокой вирусной нагрузкой ($>100\,000$ копий/мл) динамика показателей варьирует и при отсутствии лечения медленно снижается в течение нескольких лет.

На основании уровня вирусной нагрузки нельзя судить о степени повреждения функции иммунной системы и о чувствительности вируса к АРВ препаратам.

2.2.5. Резистентность ВИЧ.

Причиной возникновения лекарственно-устойчивых (резистентных) вариантов ВИЧ считается высокая скорость размножения вируса (около 10 млн. новых вирусных частиц ежедневно) в сочетании с исключительно высокой частотой ошибок, происходящих в ходе обратной транскрипции. Ошибки приводят к появлению мутаций в составе генома ВИЧ, в том числе и в области гена *pol*, кодирующей ферменты ВИЧ – объекты антиретровирусной терапии (АРТ). Эта особенность ВИЧ, лежащая в основе его беспрецедентной изменчивости, не связана с лечением и является природным свойством ВИЧ, однако некоторые мутации в составе гена *pol* могут приводить к снижению чувствительности ВИЧ к лекарствам.

Резистентность оказывает влияние на выбор стратегии лечения. Проверка резистентности до начала лечения или после увеличения вирусной нагрузки в процессе лечения может выявить от какого препарата следует отказаться и назначить оптимальную концентрацию препаратов. *In vivo* резистентность обычно отрицательно сказывается на показателе вирусной нагрузки. В организме инфицированного пациента происходит селекция вариантов и появление наиболее патогенных и резистентных вирусов.

Под лекарственной резистентностью понимают устойчивость ВИЧ к АРВ препаратам.

Причинами формирования резистентности являются:

1) высокая генетическая вариабельность популяции ВИЧ и относительная подвижность этих вариантов в присутствии одного или более АРВ препаратов и

2) присутствие АРВ препаратов в субоптимальной концентрации, создающей селективное давление. Лекарственная резистентность формируется только при сочетании двух этих факторов (репликации вируса при наличии субоптимального лекарственного пресса), что обычно наблюдается в условиях некачественного проведения АРТ при низкой приверженности пациента к лечению.

Резистентность подразделяют на *первичную*, которая определяется у АРТ-наивных пациентов (т.е. вирус имеет резистентность уже к моменту инфицирования человека), и *вторичную*, которая развивается в процессе

применения АРТ у данного конкретного пациента. Частота первичной резистентности зависит от интенсивности предшествующего применения АРТ в отдельном регионе, в развитых странах в среднем составляя 10-20%. Частота первичной резистентности в популяции более 5% считается высокой (табл. 8).

Главная причина формирования резистентности ВИЧ к АРВ препаратам в процессе АРТ – это неадекватная приверженность пациента к лечению.

Клиническими последствиями развития резистентности в процессе АРТ являются констатация вирусологической неэффективности текущей схемы АРТ, появление ограничений в последующем выборе препаратов и возможность передачи резистентных штаммов в популяции.

Развитие резистентности в процессе АРТ зависит от генетического барьера препаратов (числа мутаций, необходимых для развития резистентности) и коэффициента ингибирования ВИЧ препаратами (показателя, отражающего насколько легко при снижении концентрации препарата происходит вхождение в зону селективного давления, где развиваются мутации резистентности). Число мутаций, необходимых для развития резистентности, составляет: для всех ННИОТ и ЗТС – единичная мутация (быстрое развитие резистентности), для большинства НИОТ и некоторых ИП – 2-4 мутации (среднее развитие), для многих ИП (LPV/r, ATV, DRV) – 5 и более мутаций (медленное развитие). Низкий генетический барьер имеют препараты ННИОТ, высокий – ИП, очень высокий – бустированные ритонавиром ИП.

Стартовая схема АРТ должна иметь максимальную эффективность, в том числе и с позиций возможного развития резистентности.

При отмене АРВ препарата, к которому развилась резистентность, мутантный штамм ВИЧ перестает быть доминантным, поэтому при лабораторном исследовании может перестать определяться. Но это наблюдаемое «восстановление чувствительности к препарату» является весьма относительным, поскольку при возобновлении приема данного препарата сохраняющиеся в департаментах мутантные штаммы могут получить конкурентное преимущество и снова перейти в доминантное состояние. Вероятно поэтому повторное назначение того же АРВ препарата значительно менее эффективно, чем первое назначение.

Существует две основные методики определения резистентности ВИЧ: *генотипирование и фенотипирование*.

Методы *фенотипирования* не определяют индивидуальных мутаций, но зато позволяют оценить их совокупный вклад в резистентность вируса и дают наиболее приближенный к действительности результат, поэтому они считаются «золотым стандартом» определения резистентности ВИЧ. В практике диагностических лабораторий во всем мире фенотипические тесты применяются тогда, когда надежность результата имеет критическое значение, то есть, как правило, у пациентов, испытавших неуспех АРТ неоднократно. Для рутинного анализа эти тесты не используют по причине их высокой дороговизны и длительности выполнения. В настоящее время в России ни один из фенотипических тестов не зарегистрирован.

Применение *генотипирования* ВИЧ повышает эффективность комбинированного противовирусного лечения поскольку на основании определения генотипа возбудителя в схему лечения можно вносить необходимые коррективы. Исследователи обследуя больных выявили резистентность у каждого девятого ВИЧ - инфицированного, не получавшего ранее антиретровирусную терапию. Широкое применение противовирусных препаратов приводит неизбежно к появлению резистентных штаммов, обусловленных как рекомбинацией так и мутационным процессом.

Генотипирование проводится с помощью различных модификаций ПЦР, позволяет выявить генотип и мутации в геноме возбудителя, при ВИЧ-инфекции, генотипирование лучше проводить на ранних этапах лечения. Частота ложноположительных и ложноотрицательных результатов ниже 1%, если в образцах преобладают либо мутантные, либо дикие штаммы ВИЧ. Чувствительность переменчива, если популяция ВИЧ в образце представлена смесью диких и мутантных штаммов ВИЧ. Мутантный штамм выявляется стандартными методами определения нуклеотидной последовательности только если он составляет 10-20% популяции ВИЧ.

При проведении эпидемиологического расследования случаев ВИЧ-инфекции рекомендуется использовать в качестве дополнительного инструмента – *генотипирование и филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей*, для установления связи между источником и пострадавшим ((п. 6.4.1. СП 3.1.5.2826-10 «Профилактика ВИЧ-инфекции)).

Три важнейших факта о тестах на лекарственную устойчивость:

а) если устойчивый штамм не выявлен – это не означает, что его нет: просто его численность слишком мала; б) наиболее информативны тесты проводимые на фоне безуспешного лечения; в) тесты выполнимы при количестве вируса не менее 500- 1000 копий /мл.

Генотипические тесты (ГТ) определяют характер специфических мутаций в геноме ВИЧ, связанных с наличием устойчивости. Такие мутации чаще связаны с заменой аминокислоты в ферменте (ревертаза или протеаза). Эти тесты просты в исполнении, по сравнению с фенотипическими.

При генотипировании проводят анализ последовательности генома ВИЧ, выделенного от пациента, в сравнении с референсной последовательностью «дикого/чувствительного ко всем препаратам» вируса. Мутации ВИЧ определяют как отличия в аминокислотных последовательностях по сравнению с референсным штаммом. Полученный результат подвергают компьютерному анализу в программах, составленных на основе закономерностей, описанных в литературе, с учетом накопленных клинических данных.

Некоторые наиболее важные базы данных о профилях устойчивости и интерпретации результатов генотипирования открыты для бесплатного доступа в интернете. В настоящее время генотипический метод все более широко применяется в клинической практике, определение генотипической лекарственной устойчивости осуществляется с помощью метода

секвенирования (от англ. sequence – последовательность) – т.е. определения последовательности нуклеотидов в исследуемом участке генома ВИЧ.

Для клинической практики предпочтительнее определение генотипической резистентности, чем фенотипической, поскольку информативность этих двух исследований сопоставима, но генотипирование имеет более низкую стоимость и более короткое время получения результатов теста.

Оценка истинной устойчивости затруднена в связи со способностью мутаций к взаимодействию. Конечный итог не всегда равен сумме результатов одновременного их проявления. Причиной неоднозначной трактовки генотипирования является отсутствие алгоритма, непосредственно связывающего между собой генетический код с функцией кодируемых ферментов.

Расшифрованы несколько тысяч генетических последовательностей различных штаммов ВИЧ, что позволяет выявить специфические мутации и определить устойчивость к определенным препаратам. ВИЧ чрезвычайно вариабелен, поэтому точность генотипического анализа составляет 60- 70% по сравнению с данными фенотипического анализа. В России генотипирование производится методом секвенирования. Метод основан на определении полной последовательности (секвенировании) участка генома, кодирующего синтез ревертазы и протеазы (гена *pol*). Этот метод позволяет получить информацию о всех нуклеотидах исследуемой последовательности РНК/ДНК и выявить новые мутации генома ВИЧ. При неэффективности схемы терапии, содержащей ингибитор интегразы, тестируется ген интегразы.

Результаты секвенирования достоверны не более 1 месяца. На российском рынке представлены как зарубежные, так и отечественные тест-системы для определения устойчивости ВИЧ.

При установлении мутаций резистентности можно констатировать неэффективность отдельных АРВ препаратов; по результатам теста можно точно сказать, какие препараты назначать в дальнейшем не следует, но сложнее определить оптимальные препараты для последующего лечения.

При повторном назначении АРВ препарата ранее леченному им пациенту учитывают не только данные определения резистентности (тест может констатировать «ложную чувствительность» ВИЧ к препарату, который имеет мутации резистентности, но на момент исследования находится в минорном состоянии или сохраняется в департаментах), но и данные о клинической эффективности данного препарата при предыдущем его использовании. Повторное назначение препарата, к которому ранее была сформирована резистентность, приведет к переходу мутантных штаммов из минорного состояния в доминирующее и неэффективности лечения.

В ходе размножения резистентных вирусов всегда образуется популяция латентных клеток, содержащих провирусную ДНК с мутациями устойчивости – так называемый «архив» резистентных вариантов ВИЧ. Выявить такие мутации обычными методами нельзя, так как все применяемые тесты рассчитаны на анализ РНК ВИЧ, содержащейся в плазме крови и

отражающей состояние последнего поколения размножающихся вирусов. В практическом отношении это означает, что после отмены препарата АРТ, к которому зарегистрированы мутации лекарственной устойчивости, и замены схемы лечения в организме человека всегда остается резервуар устойчивых вариантов. В случае повторного применения неуспешных препаратов «архив» в короткие сроки способен дать начало новой популяции устойчивых вариантов ВИЧ, получающих в такой ситуации селективные преимущества. Именно по этой причине повторное использование лекарств при условии когда-либо прежде подтвержденной устойчивости к ним категорически не рекомендуется, несмотря на то, что анализ генома может уже не выявлять мутации в составе РНК ВИЧ. Новая схема всегда основывается на препаратах, устойчивость к которым никогда не была зарегистрирована (за исключением случаев перекрестной устойчивости), либо препаратах нового класса.

Известно, что часть устойчивых вариантов ВИЧ способна передаваться при заражении любым способом. Это явление, получившее название передающейся устойчивости ВИЧ, достаточно широко распространено, например, в большинстве стран Западной Европы доля пациентов, зараженных устойчивыми вирусами, составляет около 9%. Однако в некоторых европейских странах этот показатель достигает значений более 18%. После заражения устойчивым вариантом ВИЧ в течение срока от нескольких месяцев до нескольких лет может произойти замещение этого варианта «диким» штаммом в результате микроэволюционных процессов. Это означает, что в составе РНК ВИЧ мутации устойчивости (например, к препаратам первой схемы) через неопределенный срок после заражения могут быть не выявлены, при этом в «архиве» вируса сохраняются «устойчивые» провирусы.

Не все приводящие к формированию резистентности ВИЧ мутации известны, постоянно появляются новые мутации. Следовательно, результаты генотипирования могут не совпадать с фенотипическими свойствами вируса. Поэтому при невыявлении мутаций резистентности к текущим препаратам у пациента с неэффективностью АРТ, развившейся на фоне высокой приверженности к лечению, целесообразно определять фенотипическую резистентность.

Классическое фенотипирование – метод, основанный на культивировании возбудителя. Выявляется способность вируса размножаться в присутствии лекарственного препарата. При фенотипировании проводят сравнение выращенных в культуре изолятов вируса, полученных от пациента, с референс-вариантами вируса в присутствии или отсутствии различных антиретровирусных препаратов. С помощью фенотипического метода можно количественно оценить чувствительность ВИЧ к АРП. Для этого определяют репликацию ВИЧ в культурах клеток с возрастающими концентрациями АРП и сравнивают ее с репликацией дикого штамма вируса.

Фенотипическая устойчивость определяется по IC₅₀ (концентрация препарата на 50% подавляющая размножение вируса, по сравнению с

лабораторным чувствительным штаммом). Проводится в специализированной лаборатории, требует 2-4 недель, метод биологичен и непосредственно отражает влияние всех мутаций в их взаимодействии. Существует прямая корреляция между фенотипом вируса и клиническим течением: вирусы с выраженным симпластообразующим действием, высоким уровнем репликации чаще выделяются на стадии СПИДа, в отличие от штаммов с низкой реплицирующей активностью и отсутствием симпластообразования, которые выявляются чаще на ранних стадиях. Уровень вирусной нагрузки для фенотипических исследований ограничен 1000 копий /мл, при этом содержание мутантного вируса должно составлять не менее 20%.

Генотипирование и филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей необходимо использовать в качестве дополнительного инструмента при проведении эпидемиологического расследования случаев ВИЧ-инфекции, предположительно связанных с оказанием медицинской помощи или других сложных случаев. Филогенетический анализ применяется с целью обеспечения дополнительной доказательной базы при определении связанности лиц - участников цепи передачи ВИЧ-инфекции.

Современный фенотипический метод упрощен и основан на применении технологии рекомбинантных ДНК:

- 1) Амплификация РНК вируса, выделенного из исследуемой плазмы.
 - 2) Встраивание амплифицированного участка вирусного генома, содержащего гены протеазы и ОТ в состав модифицированного ВИЧ, включающего ген люциферазы светлячка (вектор).
 - 3) Заражение чувствительных к ВИЧ клеток рекомбинантным вирусом.
 - 4) Внесение препаратов и определение чувствительности по уровню свечения цитоплазмы, вследствие активности продукта гена люциферазы.
- Контроль – референс-штаммов ВИЧ.

Выводы: Изучение устойчивости производится в отдельно взятом образце плазмы и, таким образом, отражает состояние популяции в момент забора крови, а она постоянно находится в движении. Тестирование следует проводить на фоне продолжающейся терапии или через 2 недели после ее отмены. После стратегического прекращения терапии жизнеспособность ВИЧ остается сниженной в течение 10 недель, после чего репликация вируса усиливается, и в популяции начинают преобладать наиболее жизнеспособные варианты. Мутации, которые присутствуют в геноме на момент инфицирования, сохраняются дольше, чем мутации, возникающие в процессе лечения. Сохранность мутаций зависит от их влияния на репликативную способность ВИЧ: некоторые перестают обнаруживаться через несколько недель, другие обнаруживаются через год после отмены терапии.

При инфицировании «мутантным/устойчивым» вариантом вируса его доля в организме инфицированного человека составляет приблизительно 80–100%. В результате обратных мутаций возможна реверсия к дикому типу, однако устойчивые штаммы ВИЧ могут сохраняться в организме пациентов от 1 года до нескольких лет.

Методы исследования вируса на резистентность дают наиболее точные результаты в отношении препаратов, которые пациент принимал на момент тестирования или закончил принимать не более чем за 4 недели до проведения тестирования, поскольку популяция вируса дикого типа может восстановиться уже через 4 недели после отмены АРТ.

Мутации, которые присутствовали в геноме вируса на момент инфицирования, сохраняются дольше, чем мутации, возникшие в процессе лечения. Длительность персистирования мутации в определенной мере зависит от степени влияния мутации на репликативную способность вируса. Например, мутация M184V снижает репликативную способность вируса и обычно перестает обнаруживаться через 5-20 недель после отмены АРТ. В то же время мутация K103N может обнаруживаться спустя 9-12 месяцев после отмены терапии и даже позже.

Чтобы оценить резистентные свойства штаммов, которые в настоящий момент в популяции вируса в организме пациента составляют меньшинство (10-20%), следует проанализировать результаты предыдущих тестирований вируса на резистентность и анамнез АРТ, включая продолжительность приема препаратов на фоне признаков вирусологической неэффективности.

Вопрос о назначении генотипирования ВИЧ в клинической практике возникает в четырех основных ситуациях – анализ генотипа ВИЧ сразу после постановки диагноза «ВИЧ-инфекция», впервые назначаемая терапия (у «наивных» пациентов), замена схемы в случае наличия признаков вирусологического неуспеха и замена вирусологически успешной схемы. Чаще всего реализуется третья ситуация.

2.3. Культивирование ВИЧ *in vitro*

Первые изоляты ВИЧ были получены в лаборатории Р.Галло (R.Gallo) в 1982 году. Для выделения ВИЧ использовали первичную культуру клеток (моноклеарные клетки крови) и перевиваемые линии (U-937, Molt-4, CEM). В качестве материала обычно используют лимфоциты периферической крови, ливор, амниотическую жидкость, биопсийный материал мозга и солидных лимфоидных тканей и пр.

Основные этапы культивирования ВИЧ включают:

- а) выделение и культивирование моноклеаров периферической крови *in vitro* с митогеном ФГА в течение 3 суток;
- б) выделение моноклеаров ВИЧ-инфицированного пациента;
- в) сокультивирование простимулированных клеток донора с клетками пациента в присутствии фактора роста Т-лимфоцитов - интерлейкина-2;
- г) культивирование проводится в течение 3-4 недель, с постоянным контролем и добавлением простимулированных клеток донора.

Для индикации вируса регулярно просматривают культуру клеток под световым и электронным микроскопом на наличие ЦПД (синцитиев) и вируса. Кроме того, используют определение обратной транскриптазы в надосадочной жидкости, исследуют экспрессию антигена путем непрямой иммунофлюоресценции, определяют антиген ВИЧ в ИФА, выявляют

нуклеотидные последовательности ВИЧ молекулярно-генетическими методами.

У одного и того же пациента на разных стадиях заболевания накапливаются различные антигенные варианты одного и того же изолята ВИЧ. Эта генетическая вариабельность представляет серьезную проблему при конструировании вакцинных и диагностических препаратов, а также играет важную роль в возникновении резистентности к противовирусным препаратам. Высокая генетическая изменчивость ВИЧ была доказана при сравнительном анализе вариантов, выделенных от лиц инфицированных одним и тем же штаммом (доноры и реципиенты крови).

Культивирование ВИЧ *in vitro* практически не дает ложнопозитивных результатов и является стандартом качества при диагностике ВИЧ-инфицированных.

Выделение и идентификация культуры ВИЧ является достоверным признаком инфицирования ВИЧ, однако, этот метод малодоступен, дорогостоящий, требует длительного времени, высокой квалификации исполнителей, специального оборудования, соблюдения специального сан. эпидрежима (2 группа патогенности). Поэтому выделение вируса и его идентификация проводятся только в научных целях.

2.4. Исследование методом проточной цитометрии

Лимфоциты – единственные клетки организма, способные специфически распознать собственные и чужеродные антигены и отвечать активацией на контакт.

Лимфоциты делятся на три популяции: Т-лимфоциты, В-лимфоциты и нормальные киллеры (NK-клетки).

Т- лимфоциты включает в себя популяцию Т-хелперов (CD4+) цитотоксические лимфоциты (CD8+). Сочетание поверхностных молекул лимфоцитов принято обозначать порядковыми номерами «кластеров дифференцировки» (clusters of differentiation – CD) обозначается как поверхностный фенотип клетки, а отдельные поверхностные молекулы называются «маркерами», т.к. служат метками конкретных субпопуляций и стадий дифференцировки Т-лимфоцитов.

Основная функция CD4+Т-лимфоцитов – это продукция цитокинов, активирующих функции других клеток, в связи с этим эти клетки называют (helper) хелперами и обозначают соответственно Th. Основной функцией CD8+Т-лимфоцитов является цитотоксичность т.е. способность убивать клетки-мишени, инфицированные вирусом, в связи с этим их называют цитотоксическими Т-лимфоцитами и обозначают CTL.

Мембранный белок ВИЧ gp120 обладает высоким сродством к рецептору CD4 и поэтому при инфицировании в патологический процесс в первую очередь вовлекаются клетки имеющие этот рецептор. Измерение уровня CD4-Тлимфоцитов позволяет судить о глубине развивающегося у больного иммунодефицита – это стандартное исследование является

надежным прогностическим критерием, который принимают во внимание при назначении ВААРТ.

Современный метод детекции субпопуляций иммуноцитов основан на применении моноклональных антител и проточного цитофлюориметра – прибора, который сочетает принцип работы флюоресцентного микроскопа и гематологического анализатора.

Вирус иммунодефицита человека вызывает инфекционное заболевание, при котором первичное вирусное поражение иммунной системы приводит к развитию выраженного вторичного иммунодефицита. В организме больного формируется иммунная дисфункция, которая всегда обуславливает развитие различных инфекционных процессов, индуцируемых непатогенными для здорового человека микроорганизмами, а также других патологических состояний, приводящих в конечном итоге к летальному исходу.

Ведущее иммунологическое проявление ВИЧ-инфекции – дезорганизация клеточного иммунитета с резким снижением хелперной функции, осуществляемой CD4-позитивными лимфоцитами.

Именно CD4 антиген Т-лимфоцитов играет ключевую роль в развитии механизмов иммунного повреждения при ВИЧ-инфекции, поскольку является основным рецептором для вируса иммунодефицита человека. Высокая степень избирательного поражения клеточных структур, несущих рецептор CD4, определяется сродством вирусного мембранного гликопротеида gp120 (gp105 - в случае ВИЧ-2) к CD4, поэтому в патологический процесс вовлекаются в первую очередь и в большей степени CD4- лимфоциты, моноциты крови, макрофаги тканей, дендритные и другие клетки, имеющие CD4 - рецепторы. Степень поражения тех или иных клеток, несущих CD4 рецепторы, зависит от плотности этих рецепторов на мембране клеток. Наиболее высока плотность CD4 на Т-хелперной субпопуляции лимфоцитов, что и определяет во многом патогенез болезни.

Механизм иммунного повреждения – ключевой вопрос патогенеза ВИЧ-инфекции. Фиксация вируса через gp120 ВИЧ-1 (или gp105 в случае ВИЧ-2) с мембранным рецептором CD4 клетки хозяина блокирует основную функцию этих иммунокомпетентных клеток - восприятие сигналов от антигенпрезентирующих клеток. Кроме того, сходство участков в составе белков gp120, главного комплекса гистосовместимости (HLA) класса II и CD4-рецепторов обуславливает перекрестное реагирование образующихся к ВИЧ антител с этими структурами. Это ведет к блокаде кооперации CD4-лимфоцитов и HLA II. При этом антитела к gp120 ВИЧ, реагируя с CD4, вызывают неадекватную стимуляцию CD4 - клеток. Последующая за рецепцией репликация вируса ведет к выпадению функции инфицированных CD4- клеток, развитию иммунодефицита и в дальнейшем к программированной клеточной гибели - апоптозу. При этом, чем активнее в функциональном отношении CD4- клетки, тем выше процесс репродукции вируса. Все регуляторы, активирующие CD4- клетки, обеспечивают увеличение репликации вируса. К подобным регуляторам относятся фактор некроза опухолей (ФНО), фактор, стимулирующий колонии

гранулоцитов/макрофагов, интерлейкин-6 (ИЛ-6) и др. К негативным регуляторам, тормозящим репликацию вируса, относятся интерферон (ИФ) и трансформирующий фактор роста. В организме соотношение Th1 и Th2 CD4⁺ лимфоцитов взвешенно и конкурентно; суперэкспрессия цитокинов одного типа клеток ведет к супрессии другого. У больных ВИЧ-инфекцией имеет место угнетение Th1 CD4⁺ хелперов, стимулирующих клеточный иммунитет, что приводит в результате к развитию сопутствующих вирусных и онкологических заболеваний.

Измерение уровня CD4-лимфоцитов позволяет судить о глубине развившегося у больного иммунодефицита. Это стандартное исследование, проводимое для оценки вероятности прогрессирования ВИЧ-инфекции, поскольку прогрессивное уменьшение количества CD4 Т-лимфоцитов является одним из основных маркеров ВИЧ-инфекции, обуславливающих развитие вторичных заболеваний. Это самый надежный прогностический показатель темпа прогрессирования заболевания, а также критерий для принятия решений в отношении назначения антиретровирусной терапии и профилактики оппортунистических инфекций.

Чем длительнее период времени, проходящий от сероконверсии ВИЧ до снижения иммунорегуляторного индекса (отношения CD4/CD8) до значения меньше единицы, тем вероятнее медленное прогрессирование ВИЧ-инфекции. Уровень CD4-лимфоцитов перед началом лечения определяет эффективность терапии и прогноз течения заболевания.

В настоящее время проточная цитометрия является одним из наиболее высокочувствительных и объективных методов определения различных популяций и субпопуляций лимфоцитов.

Принципы технологии проточной цитофлюориметрии.

В проточном цитофлюориметре клетки друг за другом проходят через лазерный луч, при этом анализатор измеряет два типа параметров – параметры светорассеяния и параметры флюоресценции.

Принципы работы проточной ячейки цитофлюориметра: клетки впрыскиваются в проточную ячейку, которую пересекает луч лазера. Давление омывающей жидкости позволяет обеспечить направление движения и положение клеток в струе, а также прохождение их через луч лазера друг за другом. Клетки, проходящие через луч лазера, рассеивают свет. Детекторы, регистрирующие прямое светорассеяние, располагаются напротив лазерного луча, а детекторы, регистрирующие боковое светорассеяние – под углом 90° к лазерному лучу. По величине сигнала прямого светорассеяния можно судить о размере (т.е. объеме) клетки, а по величине бокового светорассеяния – о гранулярности (например, зернистости цитоплазмы) клетки.

Помимо измерения параметров светорассеяния проточный флюориметр регистрирует также параметры флюоресценции. При этом идентификация клеток происходит на основании наличия или отсутствия у них определенных поверхностных антигенов, выявляемых с помощью моноклональных антител, меченых флюорохромами.

Антитела к разным поверхностным антигенам, меченые разными флюоресцентными метками, позволяют выявлять сразу несколько поверхностных антигенов. Для увеличения количества распознаваемых флюорохромов в проточном цитофлюориметре может быть два и даже три источника лазерного излучения. Лазеры испускают лучи с разной длиной волны и вызывают свечение разных флюорохромов, что повышает количество распознаваемых прибором флюоресцентных меток.

Принципы метода исследования.

Перед анализом образцов крови в случае двухплатформенной технологии в образцах крови подсчитывается общее количество лейкоцитов и лимфоцитов на гематологическом анализаторе. Затем к образцу цельной крови добавляются моноклональные антитела, меченые флюорохромами, которые специфически связываются с поверхностными антигенами лейкоцитов и лимфоцитов. При одноплатформенной технологии исследуемый образец крови сразу же вносится в пробирку, содержащую референсные частицы с известной концентрацией. Далее после инкубации окрашенные образцы обрабатываются лизирующим раствором для разрушения эритроцитов и после отмывки или без нее анализируются на проточном цитометре. Окрашенный образец через пробозаборник вводится в проточный цитометр и проходит в узком потоке омывающей жидкости через путь лазерного луча. В результате возбуждения лазерным лучом окрашенные клетки флюоресцируют и испускаемые сигналы собираются и детектируются проточным цитометром. Использование 3-4 флюорохромов позволяет проводить одновременный 3-4-х цветный анализ, поскольку эмиссия каждого флюорохрома происходит на различных длинах волн. Данные флюоресценции и прямого и бокового светорассеяния анализируются автоматически с помощью программного обеспечения и выражаются в процентном отношении (число положительно прореагировавших клеток в популяции лимфоцитов) или в виде абсолютного значения (число положительно прореагировавших клеток в микролитре крови).

Необходимые условия:

- абсолютные значения субпопуляций лимфоцитов не могут сравниваться между лабораториями, поскольку они варьируют в зависимости от используемых методов;
- для получения оптимальных результатов пробы крови должны быть окрашены в течение 6 часов после венепункции в случае двухплатформенной технологии;
- охлажденные образцы крови могут давать искаженные результаты;
- образцы пациентов, получающих иммуносупрессивную и кортикостероидную терапию, могут давать слабое разрешение;
- присутствие бластных клеток и ядерных эритроцитов может также искажать результаты анализа. В подобных пробах может наблюдаться недостаточный лизис ядерных эритроцитов. Это может также иметь место при исследовании проб пациентов с определенными гематологическими нарушениями, при

которых эритроциты трудно разрушить, например, миелофиброз и сфероцитоз. В результате ядерные эритроциты будут расценены как дебрис.

Выбор методики для подсчета CD4- лимфоцитов должен осуществляться с учетом особенностей и возможностей конкретной лаборатории. Рекомендуемыми является 3-х и 4-х цветный анализ с гейтированием по CD45+ в сочетании с боковым светорассеянием или методика PLG.

Рекомендуемые Центром Контроля Заболеваемости (CDC) комбинации (панели) моноклональных антител:

- трехцветные панели: CD45/CD3/CD4; CD45/CD3/CD8; CD45/CD3/CD19

- четырехцветные панели: CD45/CD3/CD4/CD8; CD45/CD3/CD19/CD16(56)

Стандартная методика определения субпопуляций лимфоцитов подразумевает использование дорогостоящих проточных цитометров и гематологических анализаторов.

Проточные цитофлюориметры последнего поколения – BD FACSCaliburTM, BD FACSCanto2TM, COULTERR EPICS XLTM и XL-MCLTM и другие анализаторы могут использоваться как для одноплатформенных, так и двухплатформенных исследований, могут быть доукомплектованы автоматическими устройствами подачи образцов, отличаются высокой производительностью. Из недостатков данных анализаторов нужно отметить высокую стоимость.

Правила забора крови для иммунологических исследований

Кровь забирают утром натощак из локтевой вены одноразовой иглой в специальную вакуумную систему для взятия венозной крови - вакутейнер, содержащий антикоагулянт КЗ-ЭДТА ($1,5 \pm 0,15$ мг на 1 мл крови, сиреневая крышка). Жгут снимают сразу же после попадания иглы в вену. Длительность наложения жгута не должна превышать 1 минуты. Кровь для исследования должна поступать в вакутейнер свободным током. При взятии пробы из артериальных или венозных катетеров канюлю промывают физиологическим раствором, первые 5 мл крови сбрасывают, а затем берут пробу.

Перемешать содержимое вакутейнера сразу же после взятия крови, осторожно переворачивая пробирку 8-10 раз для лучшего контакта антикоагулянта с кровью во избежание образования сгустков. Применение вортексов и встряхивание пробирок недопустимо, так как может привести к гемолизу и получению неверных результатов. Требуется правильное соотношение крови и антикоагулянта (дозированный вакуум обеспечивает точное соотношение крови и антикоагулянта, недостаточное количество крови может привести к искажению результатов иммунофенотипирования).

Взятие крови шприцом без антикоагулянта с последующим помещением в пробирку недопустимо из-за формирования микросгустков и гемолиза.

Не рекомендуется брать кровь после физической нагрузки, приема или инъекции медикаментов, рентгенологических и физиотерапевтических

процедур. В день накануне взятия крови пациенту лучше воздержаться от употребления алкоголя, большого количества пищи, в особенности жирной, а также от чрезмерной физической нагрузки.

На пробирке с образцом указывают фамилию пациента и время забора крови.

В направлении на исследование указывают фамилию, имя и отчество пациента, возраст, пол, дату и время забора крови. Если в момент обследования пациент принимает лекарственные препараты (цитостатики, антибиотики, гормоны), в направлении должны быть сделаны соответствующие пометки.

Пробы крови хранятся до исследования при комнатной температуре, так как образцы крови, охлажденные перед анализом, могут давать искаженные результаты при иммунологическом исследовании.

Вакутейнеры с образцами крови и направления на анализ доставляются в лабораторию на исследование не позднее, чем через 4 часа после забора крови.

Транспортировка материала осуществляется в специальных медицинских контейнерах, вакутейнеры в них должны находиться в вертикальном положении, направления на исследования — в отдельном полиэтиленовом пакете. Транспортировка материала должна быть щадящей для уменьшения воздействия механического фактора и исключения нарушения температурного режима.

Нарушения, допущенные при заборе и транспортировке образцов крови, могут повлиять на результаты анализа и дальнейшую его интерпретацию.

Диапазон нормальных значений CD4-лимфоцитов

В большинстве лабораторий за норму принято количество лимфоцитов CD4+ 800–1050 кл/мкл; диапазон в два стандартных отклонения составляет приблизительно 500–1400 кл/мкл.

К факторам, влияющим на результат определения количества CD4+-лимфоцитов, относятся особенности используемого лабораторного метода, сезонные и суточные колебания, некоторые интеркуррентные заболевания, прием некоторых препаратов, в частности кортикостероидов и цитостатиков. По причине существенных различий в используемых методах расчета количества CD4+-лимфоцитов, диапазон нормальных значений довольно широк (500–1400 кл/мкл). Объясняется это тем, что для расчета количества CD4+-лимфоцитов предварительно, как правило, определяют три параметра: общее количество лейкоцитов, абсолютное содержание и процентное содержание лимфоцитов, что увеличивает вероятность ошибок. Кроме того, количество лимфоцитов CD4+ зависит от времени года и времени суток: минимальный уровень наблюдается в 12:30, а максимальный — в 20:30.

Умеренное снижение количества CD4-лимфоцитов отмечается при некоторых острых инфекциях и в послеоперационном периоде. Резкие изменения количества лимфоцитов CD4+ может вызвать терапия кортикостероидами и цитостатиками. Подобные изменения числа лимфоцитов CD4+, возможно, обусловлены перераспределением лимфоцитов

между периферической кровью и костным мозгом, селезенкой и лимфоузлами. Анализ данных большого числа наблюдений показал, что количество CD4+-лимфоцитов является самым надежным прогностическим показателем риска развития оппортунистических инфекций.

Измерение уровня CD4-лимфоцитов позволяет судить о глубине развившегося у больного иммунодефицита. Уровень снижения количества CD4+-клеток служит критерием для определения вероятности возникновения тех или иных вторичных заболеваний. У взрослых пациентов, находящихся в латентной стадии заболевания, уровень CD4+-лимфоцитов обычно превышает $0,5 \times 10^9/\text{л}$ (500 клеток в мкл). Стойкое снижение CD4+ ниже этого уровня приводит к переходу ВИЧ-инфекции в стадию 4А. Снижение ниже $0,35 \times 10^9/\text{л}$ (350 клеток в мкл) и $0,2 \times 10^9/\text{л}$ (200 клеток в мкл) – в стадию 4Б и 4В соответственно. Дальнейшее прогрессирование иммунодефицита ведет к снижению показателя ниже $0,05 \times 10^9/\text{л}$ (50 клеток в мкл) вплоть до полного исчезновения CD4+-клеток. Указанные цифры носят, однако, ориентировочный характер, поскольку снижение количества CD4+-клеток, как правило, несколько опережает клиническое прогрессирование заболевания. С другой стороны, иногда больные с очень низким – менее $0,2 \times 10^9/\text{л}$ или даже $0,1 \times 10^9/\text{л}$ живут в течение нескольких лет.

Оценка динамики уровня CD4+-лимфоцитов в процессе лечения является критерием его эффективности. Увеличение этого уровня или, по крайней мере, отсутствие достоверного (более чем на 30%) его снижения через 4 недели после начала противовирусной терапии может говорить об ее эффективности.

Иммунологические параметры у детей

При интерпретации иммунологических показателей у детей младше 6 лет следует учитывать возрастные особенности. Как абсолютные, так и относительные показатели CD4+ Т-клеток у неинфицированных новорожденных значительно выше, чем у ВИЧ- негативных взрослых, однако количество CD4+ клеток постепенно в течение нескольких лет снижается и достигает нормы взрослых на шестом году жизни (табл. 3).

Учитывая возрастные изменения иммунологических показателей, разработана шкала клинических и иммунологических показателей для определения стадии ВИЧ инфекции у детей. Хотя абсолютные показатели CD4+, определяющие уровень иммуносупрессии, изменяются с возрастом, процент CD4+ клеток, соответствующий определенной иммунной категории, остается постоянным. Таким образом, относительный показатель CD4+ более достоверно отражает степень прогрессирования заболевания, чем абсолютный. Так же, как и у взрослых, количество CD4+ клеток у ВИЧ-инфицированных детей уменьшается по мере развития болезни, и их уровень определяет серьезность прогноза заболевания.

В связи с тем, что знание иммунного статуса (т.е. абсолютное и относительное количество CD4+ Т-лимфоцитов) очень важно при ведении ВИЧ-инфицированных новорожденных и детей, данные исследования

должны проводиться сразу же после получения положительных результатов ВИЧ тестирования и каждые три месяца после него.

Таблица 3.

Иммунограмма детей в возрасте от 1 до 12 лет

Иммунная категория	Абсолютное и относительное содержание CD4-лимфоцитов					
	До 12 мес.		1 год – 5 лет		6 – 12 лет	
	Абс.число кл. в 1мкл	%	Абс.число кл. в 1мкл	%	Абс.число кл. в 1мкл	%
Нет иммуносупрессии	Более 1500	Более 25	Более 1000	Более 25	Более 500	Более 25
Умеренная иммуносупрессия	750-1499	15-24	500-999	15-24	200-499	15-24
Выраженная иммуносупрессия	Менее 750	Менее 15	Менее 500	Менее 15	Менее 200	Менее 15

У ВИЧ-инфицированных новорожденных, у которых имеется иммунофенотипический вариант дефекта тимуса (т.е. количество CD4+ клеток $< 1900/\text{мм}^3$; CD8 - $850/\text{мм}^3$), прогрессирование болезни происходит гораздо быстрее, чем у новорожденных с другими вариантами иммунопатологии. У детей даже незначительное сопутствующее заболевание или вакцинация может существенно снизить абсолютные и относительные показатели CD4+ клеток. Поэтому данное исследование лучше проводить, когда клиническое состояние ребенка стабильно. Изменения показателей CD4+ могут определять изменения в тактике лечения только в том случае, если данное изменение подтверждено результатами хотя бы одного повторного анализа, проведенного с интервалом как минимум 1 неделя.

Частота определения количества CD4+ лимфоцитов

Количество лимфоцитов CD4+ определяют при первичном осмотре (исходный уровень); некоторые специалисты рекомендуют перед началом терапии определять число лимфоцитов CD4+ дважды. Количество лимфоцитов CD4+ определяют каждые 3–6 месяцев, если АРТ не проводится, и каждые 3–4 месяца на фоне АРТ. Если результат определения количества лимфоцитов не соответствует ожидаемому диапазону значений, исследование повторяют. Значимым считается изменение абсолютного количества лимфоцитов CD4+ на 30% и изменение процентного содержания лимфоцитов CD4+ на 3%. У пациентов, не получающих АРТ, количество лимфоцитов CD4+ снижается в среднем на 4% в год на каждый lg РНК ВИЧ (копий/мл).

Обычно через 4–8 недель после максимального снижения вирусной нагрузки на фоне ВААРТ количество лимфоцитов CD4+ увеличивается на 50 кл/мкл, а затем повышается еще на 50–100 кл/мкл в течение года. При

высокой вирусной нагрузке и низком количестве лимфоцитов CD4+ перед началом терапии обычно наблюдается более выраженный ответ на терапию. Несмотря на хороший вирусологический ответ на терапию, повышение количества лимфоцитов CD4+ может начаться лишь спустя некоторое время; причина такой задержки пока неясна. Прирост количества лимфоцитов CD4+ обычно коррелирует со степенью подавления вирусной нагрузки, однако может наблюдаться и нарушение этой зависимости. Тем не менее, результаты популяционных исследований показывают, что наиболее важным фактором, определяющим иммунологический ответ на ВААРТ, служит длительность эффективного подавления вирусной нагрузки.

В клинических стандартах DHHS «иммунологическая неудача» (неэффективный иммунологический ответ) определяется как отсутствие прироста количества лимфоцитов CD4+ по крайней мере на 25–50 клеток в микролитре через год от начала АРТ. После прекращения АРТ количество лимфоцитов CD4+ обычно быстро снижается; через 3–4 месяца оно может уменьшиться на 100–150 клеток в микролитре. Такое уменьшение количества лимфоцитов CD4+, как правило, не зависит от степени предшествующего снижения вирусной нагрузки и может быть обусловлено либо сниженной способностью резистентных штаммов вируса к репликации, либо сохранением частичного противовирусного действия препаратов, несмотря на развитие вирусной резистентности.

2.5. Тактика использования лабораторных методов в диагностике и мониторинге ВИЧ-инфекции.

Основные выводы:

- Диагноз ВИЧ-инфекции устанавливают при иммунохимическом обследовании (положительные результаты иммуноферментного анализа и подтверждающего теста в иммуноблотинге и качественной ПЦР).
- Применение ИФА тест-систем 4-го поколения, позволяющих определять не только антитела, но и антиген ВИЧ, приводит к сокращению периода «серологического окна».
- В экстренных ситуациях возможно применение быстрых тестов (обследование беременных с недокументированным ВИЧ-статусом, поступивших для родов, обследование при профессиональных травмах).
- Обследование детей, рожденных от ВИЧ-инфицированных матерей, проводится с помощью качественной ПЦР (ДНК ВИЧ, двукратное определение).
- Количество CD4 лимфоцитов наряду с клинической картиной используется для определения стадии ВИЧ-инфекции, установления показаний для начала АРТ и мониторинга эффективности лечения (восстановление количества CD4 лимфоцитов на фоне эффективного лечения).
- Определение вирусной нагрузки имеет значение для прогноза течения ВИЧ-инфекции (позволяет предсказать скорость снижения количества CD4

лимфоцитов), учитывается при назначении АРТ и используется для контроля эффективности лечения.

- Определение резистентности ВИЧ к антиретровирусным препаратам является важным ориентиром при назначении терапии, так как позволяет назначить оптимальную комбинацию препаратов. Выявление мутаций резистентности на фоне проводимой антиретровирусной терапии дает возможность своевременно принять решение о смене терапии.

- Качество лабораторных исследований напрямую зависит от соблюдения правил забора и транспортировки материала.

Глава3. Профилактика профессионального инфицирования ВИЧ.

С целью профилактики профессионального заражения ВИЧ-инфекцией проводится комплекс мероприятий по профилактике аварийных ситуаций при выполнении различных видов работ: (Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 21.07.2016 N 95).

Учет случаев получения при исполнении профессиональных обязанностей травм, микротравм персоналом МО, других организаций, аварийных ситуаций с попаданием крови и биологических жидкостей на кожу и слизистые. В случае выявления факта заболевания, возникшего во взаимосвязи с аварийной ситуацией, а также аварийной ситуации, в результате которой были получены увечья, телесные повреждения, повлекшие за собой необходимость перевода пострадавшего на другую работу, временную или стойкую утрату им трудоспособности либо смерть, составляются "Акт о случае профессионального заболевания" и "Акт о несчастном случае на производстве".

При возникновении аварийной ситуации на рабочем месте медицинский работник обязан незамедлительно провести комплекс мероприятий по предотвращению заражения ВИЧ-инфекцией.

Действия медицинского работника при аварийной ситуации: - в случае порезов и уколов немедленно снять перчатки, вымыть руки с мылом под проточной водой, обработать руки 70%-м спиртом, смазать ранку 5%-м спиртовым раствором йода; - при попадании крови или других биологических жидкостей на кожные покровы это место обрабатывают 70%-м спиртом, обмывают водой с мылом и повторно обрабатывают 70%-м спиртом; - при попадании крови и других биологических жидкостей пациента на слизистую глаз, носа и рта: ротовую полость промыть большим количеством воды и прополоскать 70% раствором этилового спирта, слизистую оболочку носа и глаза обильно промывают водой (не тереть); - при попадании крови и других биологических жидкостей пациента на халат, одежду: снять рабочую одежду и погрузить в дезинфицирующий раствор или в бикс (бак) для автоклавирования; - при наличии риска заражения ВИЧ-инфекцией как можно

быстрее начать прием антиретровирусных препаратов в целях постконтактной профилактики заражения ВИЧ.

Необходимо в возможно короткие сроки после контакта обследовать на ВИЧ и вирусные гепатиты В и С лицо, которое может являться потенциальным источником заражения, и контактировавшее с ним лицо. Обследование на ВИЧ потенциального источника ВИЧ-инфекции и контактировавшего лица проводят методом экспресс-тестирования на антитела к ВИЧ после аварийной ситуации с обязательным направлением образца из той же порции крови для стандартного тестирования на ВИЧ в ИФА. Образцы плазмы (или сыворотки) крови человека, являющегося потенциальным источником заражения, и контактного лица передают для хранения в течение 12 месяцев в центр СПИД субъекта Российской Федерации. Пострадавшего и лицо, которое может являться потенциальным источником заражения, необходимо опросить о носительстве вирусных гепатитов, ИППП, воспалительных заболеваний мочеполовой сферы, других заболеваний, провести консультирование относительно менее рискованного поведения. Если источник инфицирован ВИЧ, выясняют, получал ли он антиретровирусную терапию. Если пострадавшая - женщина, необходимо провести тест на беременность и выяснить, не кормит ли она грудью ребенка. При отсутствии уточняющих данных постконтактную профилактику начинают немедленно, при появлении дополнительной информации схема корректируется.

Проведение постконтактной профилактики заражения ВИЧ антиретровирусными препаратами: Прием антиретровирусных препаратов должен быть начат в течение первых двух часов после аварии, но не позднее 72 часов. Стандартная схема постконтактной профилактики заражения ВИЧ - лопинавир/ритонавир + зидовудин/ламивудин. При отсутствии данных препаратов для начала химиопрофилактики могут использоваться любые другие антиретровирусные препараты; если невозможно сразу назначить полноценную схему ВААРТ, начинается прием одного или двух имеющихся в наличии препаратов. Использование невирапина и абакавира возможно только при отсутствии других препаратов. Если единственным из имеющихся препаратов является невирапин, должна быть назначена только одна доза препарата - 0,2 г (повторный его прием недопустим), затем при поступлении других препаратов назначается полноценная химиопрофилактика. Если химиопрофилактика начата с использованием абакавира, следует как можно быстрее провести исследование на реакцию гиперчувствительности к нему или провести замену абакавира на другой НИОТ.

При наступлении аварийной ситуации, повлекшей за собой риск заражения ВИЧ-инфекцией, сотрудники медицинских организаций должны незамедлительно сообщать о каждом аварийном случае руководителю подразделения, его заместителю или вышестоящему руководителю. Аварийные ситуации должны учитываться в каждой медицинской организации в "Журнале учета аварийных ситуаций при проведении медицинских манипуляций".

С целью устранения причин аварийной ситуации, а также подтверждения связи инфекционного и/или паразитарного заболевания с исполнением служебных обязанностей работником медицинской организации следует организовать работу по эпидемиологическому расследованию аварийной ситуации.

Все медицинские организации должны быть обеспечены или иметь при необходимости доступ к экспресс-тестам на ВИЧ и антиретровирусным препаратам. Запас антиретровирусных препаратов должен храниться в любой медицинской организации по выбору органов исполнительной власти субъектов Российской Федерации в сфере здравоохранения, но с таким расчетом, чтобы обследование и лечение могло быть организовано в течение 2 часов после аварийной ситуации. В уполномоченной медицинской организации должны быть определены специалист, ответственный за хранение антиретровирусных препаратов, и место их хранения с доступом, в том числе в ночное время и выходные дни.

Для организации диспансерного наблюдения и корректирования схем химиопрофилактики ВИЧ-инфекции пострадавшие в день обращения должны быть направлены в Центр СПИД (либо к уполномоченному инфекционисту кабинета инфекционных заболеваний поликлиники по месту жительства). Сроки диспансерного наблюдения пациентов, пострадавших в аварийных ситуациях, связанных с риском инфицирования ВИЧ, - 1 год; периодичность обследования на антитела к ВИЧ (метод иммуноферментного анализа): в день (ближайшие дни после) аварийной ситуации, в дальнейшем - через 3, 6, 12 месяцев после аварии. Пострадавший должен быть предупрежден о том, что он может быть источником инфекции в течение всего периода наблюдения (максимально возможного инкубационного периода) и поэтому ему надлежит соблюдать меры предосторожности, чтобы избежать возможной передачи ВИЧ-инфекции (в течение 12 месяцев он не может быть донором, должен использовать презерватив при половых контактах и т.п.). По истечении года при отрицательных результатах лабораторных исследований пострадавший снимается с диспансерного наблюдения. В случае получения положительного результата проводится расследование обстоятельств и причин возникновения у работника профессионального заболевания в установленном порядке.

Заключение.

ВИЧ-инфекция остается на сегодняшний день ключевой проблемой здравоохранения в Европе и РФ.

В данном учебном пособии о изложены процессы, происходящие при репликации ВИЧ в организме ВИЧ-инфицированного пациента и принципы основных методов диагностики: твердофазного ИФА, проточной цитофлуорометрии, молекулярно-генетических и определение резистентности. Изложены алгоритмы, их применение и интерпретация результатов на различных этапах заболевания с учетом нормативно-правовых актов.

Результаты научных исследований последних лет, касающихся этиопатогенеза ВИЧ-инфекции, значительно расширили знания специалистов и позволили внедрить в практическую медицину методы диагностики высокой чувствительности и специфичности. Комплексное применение этих методов помогает врачам-инфекционистам успешно использовать их на практике и контролировать АРВТ.

Рекомендуемая литература.

1. ВИЧ-инфекция и СПИД. Национальное руководство под ред. В.В.Покровского. // 2013. - Москва. - Гэотар-Медиа. – 608 стр.
2. Покровский, В., Юрин, О., Кравченко, А и др. Национальные рекомендации по диспансерному наблюдению и лечению больных ВИЧ-инфекцией // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. - 2016.
3. Вопросы общей вирусологии: Учебн. пособие для врачей / под ред. О.И.Киселева и И. Н. Жилинской. - СПб.: Спектр, 2007. -172 с.
4. Женщина, ребенок и ВИЧ / под ред. Н.А.Белякова, Н. Ю. Рахманиной и А.Г.Рахмановой. – СПб, Вашингтон, 2011. -308с.
5. Воронин Е.Е., Афонина Л. Ю., Фомин Ю.А. Диагностика, клиника, лечение и профилактические мероприятия у детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями: пособие для врачей. -М.: Медицина для Вас., 2004. – 64 с.
6. Вирус иммунодефицита человека–медицина / под ред. Н.А.Белякова и А.Г. Рахмановой; 2-е издание. –С.- Пб.: Балтийский образовательный центр, 2011. -438 с.

Нормативные правовые акты.

- 1.СП 1.2.731-99. «Безопасность работы с микроорганизмами 3-4 группы патогенности и гельминтами»
- 2.СП 1.3.2322-08. «Безопасность работы с микроорганизмами 3-4 групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»
- 3.СП 3.3.2.1120-02. «Санитарно - эпидемиологические требования к условиям транспортировки, хранению и отпуску гражданам медицинских иммунобиологических препаратов, используемых для иммунопрофилактики, аптечными учреждениями и учреждениями здравоохранения»
- 4.Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.5.2826-10 "Профилактика ВИЧ-инфекции" (от 11.01.2011 г.).
- 5.О внесении изменений в СП 3.1.5.2826-10 "Профилактика ВИЧ-инфекции" (от 21 июля 2016 года № 95).
- 6.Приказ МЗ РФ № 292 от 30.07.01. «Об использовании иммуноферментных тест-систем для выявления антител к ВИЧ в сыворотке крови человека».

7.Дополнения и изменения к №1 к СП1.3.2322-08 и СП 1.3.2518-09.

8.Приказ № 170 «О мерах по совершенствованию профилактики и лечения ВИЧ-инфекции в Российской Федерации.

9.Приказ Минздравсоцразвития России №474 от 9 июля 2007 г.» Об утверждении стандарта медицинской помощи больным болезнью, вызванной вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ)».

10.Приказ Минздравсоцразвития России №475 от 9 июля 2007 г. «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным болезнью, вызванной вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) при оказании специализированной помощи».

11.Анализ лекарственной устойчивости ВИЧ. Федеральные клинические рекомендации – Москва, 2017 - 28 стр.

12.Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности. Методические указания МУ 1.3.2569-09.

13. Постановление Правительства Российской Федерации от 26 января 2010 года N 29 "Об утверждении технического регламента о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии"

Тестовые задания для самоконтроля.

Выбрать один правильный вариант ответа.

1. ВИЧ относится к:

- 1) к РНК- содержащим вирусам.
- 2) к ДНК-содержащим вирусам
- 3) к прионам
- 4) к семейству полиовирусов
- 5) к семейству герпесвирусов.

2. Какой белок ВИЧ наиболее подвержен мутациям:

- 1) gp120
- 2) p24
- 3) gp41
- 4) p17
- 5) gp160

3. Ранние антитела к ВИЧ обнаруживаются через:

- 1) 3 месяца
- 2) 2 недели
- 3) 6 месяцев

- 4) 4 недели
 - 5) 10 месяцев.
4. Высокая концентрация ВИЧ содержится в:
- 1) в слюне, поте
 - 2) в крови, семенной жидкости, грудном молоке
 - 3) в моче
 - 4) 4 в ликворе
 - 5) кале.
5. Кровь для постановки ИФА хранится не более:
- 1) 3 час.
 - 2) 12 час.
 - 3) 24 часа.
 - 4) 72 часа.
 - 5) 48 час.
6. Объем венозной крови, необходимой для постановки ИФА:
- 1) 7-10 мл
 - 2) 3-5 мл
 - 3) 10-20 мл
 - 4) 0,5 мл.
 - 5) 0,8 мл.
7. В основе патогенеза ВИЧ лежит:
- 1) поражение иммунокомпетентных клеток
 - 2) прогрессирующая дистрофия
 - 3) оппортунистические инфекции
 - 4) герпетические инфекции
 - 5) урогенитальная патология.
8. Для верификации диагноза ВИЧ-инфекции используют методы:
- 1) вирусологический
 - 2) иммуноферментный
 - 3) иммуноблот, молекулярно-генетический
 - 4) определение вирусной нагрузки
 - 5) иммунологический.
9. Для определения устойчивости ВИЧ к АРП используют методы:
- 1) иммунохимический
 - 2) генотипирование
 - 3) фенотипирование
 - 4) проточную цитофлуорометрию
 - 5) количественную ПЦР

10.Методом проточной цитофлюорометрии выявляют:

- 1) Вирусную нагрузку
- 2) CD- маркеры
- 3) Резистентность
- 4) Количество антител
- 5) Цитокины.

Эталоны ответов к тестовым заданиям.

№ вопроса	Правильный ответ	№ вопроса	Правильный ответ
1	1	6	2
2	1	7	1
3	2	8	3
4	2	9	2
5	4	10	2

Приложение 1.

Журнал учета аварийных ситуаций при проведении медицинских манипуляций

_____ Название МО									
№ пп	ФИО постра давшего мед. работн ика	Место работ ы, должн ость.	возр аст	Дата, время, место авари и.	Обстояте льства и характер аварии	Наличи е СИЗ	ФИО больного адрес, № истории болезни пациента. рез.обсл- я на ВИЧ, ВГВ,	Объемы оказывае мой помощи пострд	ФИО руков одите ля, котор ого проин форм ирова ли об авари и
1.						.		.	

УТВЕРЖДАЮ:

(подпись, фамилия, инициалы руководителя)

«_____» _____ 20_____ г.

врожденным инфекциям» на базе одного из районов города. В случае успешной реализации проекта он будет расширен, что позитивно скажется на состоянии здоровья детей нашего города.