

### ДИАГНОСТИКА ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

Диагностика ВИЧ-инфекции и СПИДа - это многоэтапный и многокомпонентный процесс. Выбор лабораторных методов зависит от задач, поставленных перед исследователем и конкретной лабораторией. Эти задачи можно подразделить на две категории: 1) Эпидемиологическая оценка и установление ВИЧ-инфекции 2) Диагностика СПИДа и мониторинг антиретровирусной терапии. Данная глава будет, в основном, посвящена диагностике ВИЧ-инфекции и эпидемиологической оценке, которую проводят путем скринирования, подтверждения и уточнения диагноза на основе определения вирусных антигенов и антител, специфичных к ним.

Скринирование – это выявление инфицированных лиц из большого числа людей, подозреваемых на наличие инфекции. Скринирование обычно осуществляется при помощи иммуноферментного анализа (ИФА) на основе определения антител, специфичных к одному или нескольким вирусным белкам.

Уточнение диагноза на основе иммуноферментного анализа путем определения антител, специфичных к вирусным антигенам, отличающимся от тех, которые применялись на этапе скринирования. Обычно скринирование и уточнение диагноза осуществляют путем использования разных тест-наборов ИФА, предназначенных для определения антител, специфичных к различным вирусным белкам.

Подтверждение диагноза на основе определения вирусных белков при помощи метода Western Blot, который иначе называют иммуноблотом. Как правило, на данном этапе диагноз считают окончательным. В целях уточнения диагноза иногда применяют полимеразную цепную реакцию (ПЦР), которая позволяет определять вирус-ассоциированные нуклеиновые кислоты – провирусную ДНК и РНК.

Многие лаборатории ограничиваются первыми двумя этапами, используя лишь ИФА для скринирования и уточнения диагноза. Это связано, прежде всего, с тем, что часто основными задачами лабораторной службы являются установление масштабов эпидемии, оценка ее географического распространения, а также разработка целевых профилактических мероприятий. В целях окончательного установления диагноза у конкретного больного, конечно же, необходимо применять иммуноблот. Выбор методов во многом зависит также и от оснащенности лабораторий. Ниже, в главе 13.6, будут представлены два варианта алгоритма лабораторной диагностики, в зависимости от задач лабораторной службы и оснащенности лабораторий.

В основе диагностики ВИЧ-инфекции лежит идентификация компонентов вирусной частицы, в основном вирусных антигенов. Знание структуры вируса и его белковых компонентов имеет большое значение в выборе методов в целях постановки правильного диагноза. Для того чтобы рассмотреть принципы диагностики ВИЧ-инфекции, имеет смысл напомнить структуру и жизненный цикл вируса ВИЧ.

В центральной части вируса, в непосредственной близости от молекулы РНК, содержится стержневой (core) белок, обозначаемый как p24. Его определение является важным компонентом диагностики ВИЧ. Помимо p24, вирион содержит множество других белков, расположенных по периферии. Они подразделяются в зависимости от того, какая часть молекулы РНК их кодирует: *env*, *gag* или *pol*. Также белки вириона могут быть либо гликопротеинами (gp), либо просто протеинами (p). В соответствии с этим, вирион ВИЧ содержит следующие белки: кодируемые *env* (гликопротеины

gp160, gp120, and gp41), *gag* (протеины p24, p17, p7, p9), и *pol* (протеины p32, p66, p51, and p11). Указанные белки могут обнаруживаться при помощи иммуноблота и иммуноферментного анализа, составляющих основу диагностики ВИЧ-инфекции.

Основной мишенью для вируса ВИЧ является Т-лимфоцит, содержащий маркер CD4 (CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцит), хотя вирус может поражать и другие клетки, такие, как макрофаги. Сразу же после внедрения вириона в клетку, уже на уровне мембраны происходит обратная транскрипция и формирование двойной молекулы ДНК, способной затем переноситься к ядру клетки и интегрироваться в геном. Инфекционный процесс в периферической крови и тканях характеризуется развитием вириона внутри клеток хозяина, его высвобождением и дальнейшим заражением других лимфоцитов. РНК вируса, а также провирусная ДНК (после обратной транскрипции) могут определяться при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Таким образом, диагноз ВИЧ-инфекции у конкретного больного можно ставить на основании обнаружения нескольких вирусных антигенов при помощи иммуноблота или противовирусных антител на основании иммуноферментного анализа, а также путем оценки наличия вирусных РНК или ДНК при помощи полимеразной цепной реакции.

Важным условием правильной диагностики ВИЧ-инфекции является объективная интерпретация результатов проведенных анализов. В этом смысле необходимо выделить следующие категории:

ВИЧ-положительные – это лица с ВИЧ-инфекцией, у которых установлены положительные результаты тестов на ВИЧ.

ВИЧ-отрицательные – это лица с отсутствием вируса ВИЧ и у которых не установлено положительных тестов на ВИЧ

Ложно-положительные на ВИЧ – это лица с положительными тестами на ВИЧ, но у которых ВИЧ-инфекция в самом деле отсутствует

Ложно-отрицательные на ВИЧ – это лица с отрицательными тестами на ВИЧ, но которые на самом деле являются ВИЧ-инфицированными.

Чувствительность метода – число положительных результатов тестирования деленное на общее число ВИЧ-положительных образцов.

Специфичность метода - число отрицательных результатов тестирования деленное на общее число образцов, в которых отсутствует вирус.

Положительная прогностическая ценность – соотношение лиц с положительными результатами тестирования на ВИЧ, которые, в самом деле, являются ВИЧ-инфицированными.

Отрицательная прогностическая ценность - соотношение лиц с отрицательными результатами тестирования на ВИЧ, которые, в самом деле, не являются ВИЧ-инфицированными.

### 13.1 Динамика иммунного ответа на ВИЧ-инфекцию и принципы серологического тестирования

Значение различных методов диагностики ВИЧ можно лучше понять в контексте с динамикой процессов, характерных для ВИЧ-инфекции (см. также рис 6.1 в главе 6). Приблизительно у 50-70% лиц спустя 2-6 недель после заражения наблюдается первичная ВИЧ-инфекция, характеризующаяся симптомами, напоминающими проявления мононуклеоза (Schacker, 1997; Clark et al, 1991; Daar et al, 1991). В течение этого, относительно короткого, промежутка времени, можно установить высокий уровень вирусемии в плазме при помощи ПЦР с обратной транскриптазой (RT-PCR assays). Кроме того, уже в этот начальный период в плазме выявляется антиген p24. Антитела к стержневым (core) и периферическим (envelope) антигенам могут определяться несколько позже, но они сохраняются в течение всего оставшегося периода жизни ВИЧ-инфицированного, который может продолжаться 10 или более лет (Allain, 1986; Gaines, 1987; Horsburgh et al, 1989).

С развитием иммунного ответа происходит резкое снижение вирусемии в плазме и, соответственно, уровня антигена p24. Однако при этом в большинстве случаев сохраняется возможность достаточно легко определять содержание вирусной РНК при помощи ПЦР. После первичной инфекции наблюдается длительный асимптоматический период, во время которого не удается определять антиген p24, так же, как попытки выращивать культуры вируса являются неэффективными. У ряда больных при развитии клинических симптомов СПИД может происходить новый скачок вирусемии и повышение концентрации антигена p24. Поскольку антитела к вирусным белкам, как правило, не обнаруживаются во время острой инфекции, серологические анализы обычно не применяются для диагностики острой инфекции ВИЧ.

Сероконверсия начинается с появления иммуноглобулинов М (IgM) к Gag протеинам вируса, с последующим переключением с IgM на IgG антитела. Переключение может иметь место в течение 1-41 недель (Bylund et al, 1992). Было показано, что последовательность появления антител класса IgG происходит следующим образом: вначале появляются антитела к белкам p24 и gp120, а после этого – к белку gp41 и к вирусным белкам с молекулярным весом между 50 и 65 килодальтон. Причем, появление антител к белку p24 сопровождается снижением его концентрации. В течение первых нескольких месяцев инфекции наблюдается возрастание титров антител IgG, а затем титры стабилизируются. Впоследствии происходит снижение титров антител к белку p24 по мере возрастания концентрации самого антигена p24. Однако, как указывалось выше, антитела к вирусным протеинам никогда не исчезают, а сохраняются пожизненно.

Диагностика ВИЧ ставится при помощи иммуноферментного анализа (ИФА) на основе повторных положительных реакций, подтвержденных иммуноблотом (см. ниже). Необходимо, однако, учитывать два важных обстоятельства. Антитела могут обнаруживаться у волонтеров, получивших экспериментальную вакцину против ВИЧ. Кроме того, ввиду пассивного переноса антител от инфицированной матери к плоду серологическое тестирование новорожденного или младенца, рожденного от ВИЧ-инфицированной матери, является бессмысленным.

## 13.2 Иммуноферментный анализ

Основу иммуноферментного анализа (ИФА) составляет применение иммобилизованных антигенов ВИЧ, к которым присоединяются антитела из образца крови человека, инфицированного ВИЧ (рис 13.1). Вирусные антигены иммобилизуют на дне пластиковых планшетов для ИФА анализа. Обычно от качества пластика зависит эффективность иммобилизации антигена, которая влияет на чувствительность ИФА анализа. Другим важным условием является качество применяемого антигена. Часто применяют вирусные лизаты. Однако предпочтительным является использование рекомбинантных вирусных белков, которые позволяют значительно повысить чувствительность и специфичность теста (Gurtler, 1996; Bylund, Ziegner, Hooper, 1992).

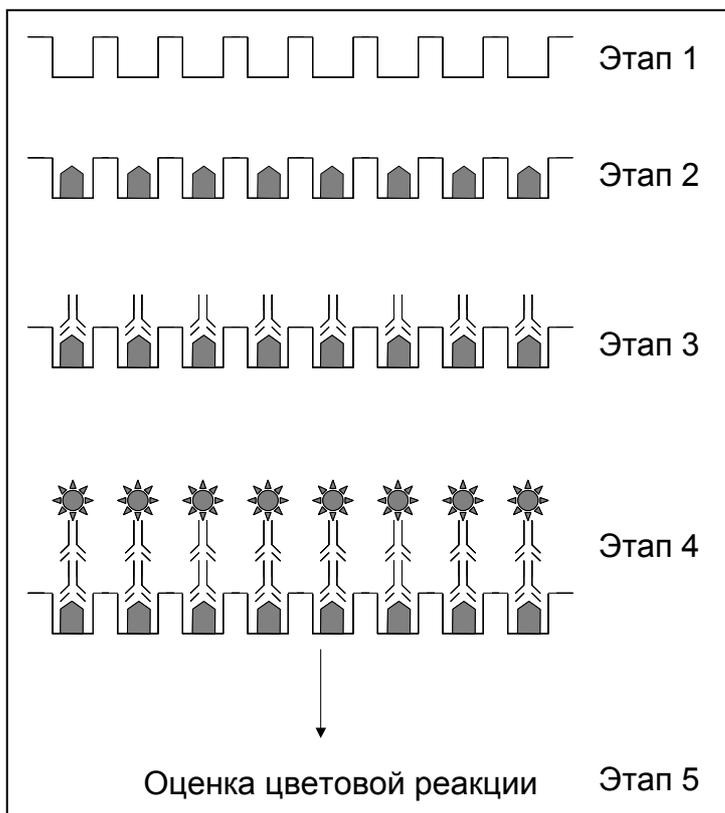
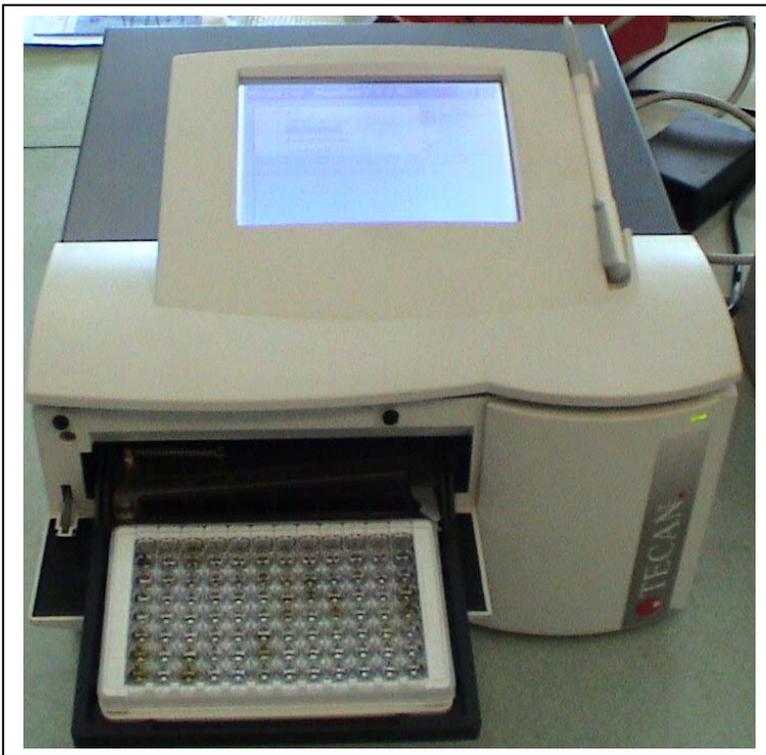


Рисунок 13.1 Этапы иммуноферментного анализа

1. 96-луночный пластиковый планшет.
2. Иммобилизация вирусного антигена (коммерческие тест-наборы выпускаются с уже иммобилизованными антигенами).
3. Добавление исследуемого образца (сыворотки крови) и связывание противовирусных антител с иммобилизованным антигеном ВИЧ.
4. Добавление проявляющих антител, конъюгированных с ферментом, по активности которого можно судить о реакции и наличии антител в исследуемом образце.
5. Оценка цветовой реакции и постановка диагноза.

В ИФА принято определять противовирусные антитела класса IgG, которые присоединяются к иммобилизованному на дне планшета вирусному антигену и тем самым «вылавливаются» из крови ВИЧ-инфицированного. Эти антитела затем обнаруживаются при помощи уже других антител, конъюгированных с ферментом со специальным красителем. Это так называемые проявляющие антитела, поскольку по их содержанию и количеству судят о наличии ВИЧ-инфекции. О присоединении этих проявляющих антител к противовирусным IgG антителам судят по активности конъюгированного фермента и на основании цветовой окраски. Положительную реакцию интерпретируют при помощи спектрофотометра (ридера) на основании степени окрашивания в сравнении с отрицательным контролем.

В целях регистрации цветowych реакций ИФА используются специальные автоматизированные иммуноферментные анализаторы (ридеры), которые основаны на принципе спектрофотометрии. Анализ проводится при помощи компьютерных программ, которые позволяют подсчитывать оптическую плотность в каждой лунке и калибровать ее по отношению к контрольным образцам. В последние годы стали широко применять ридеры с чувствительным дисплеем серии Текан (рисунок 13.2).



**Рисунок 13.2**  
**Иммуноферментный**  
**анализатор (ридер) с**  
**чувствительным дисплеем**  
**серии Tecan и планшетом,**  
**готовым для анализа.**

Чувствительность ИФА варьирует от 93 до 100 процентов, а большинство западных коммерческих тестов, как правило, имеют чувствительность около 99 процентов (Bylund, Ziegner, Hooper, 1992). Тесты ИФА могут интерпретироваться как положительные (высоко-реактивные), отрицательные (нереактивные) и неопределенные (частично реактивные). В ряде случаев могут иметь место ложно-отрицательные результаты. Это, в частности, может наблюдаться на самых начальных стадиях первичной инфекции и при тяжелой иммуносупрессии на поздних стадиях СПИДа (Farzadegan, Taylor, Hardy, et al., 1989; Farzadegan, Polis, Wolinsky, et al., 1988). Ложно-отрицательные результаты также могут явиться следствием неправильной лабораторной обработки образцов крови. Поэтому важно уделять серьезное внимание адекватности лабораторной практики.

Специфичность ИФА также обычно высокая и составляет, в среднем, около 99 процентов (Bylund, Ziegner, Hooper, 1992; Ayres, Avillez, Garcia-Benito, et al, 1990). Причинами ложно-положительных результатов могут явиться такие ситуации, как неправильная лабораторная обработка образцов крови, гемодиализ, а также ряд клинических состояний, к которым относятся аутоиммунные нарушения, множественные миеломы, гемофилия, недавно перенесенная аденовирусная инфекция и алкогольный гепатит (Bylund, Ziegner, Hooper, 1992). В связи с вероятностью ложно-положительных реакций, Всемирная Организация Здравоохранения рекомендует проводить дополнительный тест с использованием тест-наборов ИФА с отличающейся антигенной специфичностью (CDC, 1989, Carvalho, Hamerschlag, Vaz, Ferreira, 1996). Однако лучше всего подтверждать положительные реакции при помощи иммуноблота.

### 13.3 Иммуноблот

Окончательный диагноз ВИЧ-инфекции принято ставить при помощи иммуноблота. Методика заключается в инкубировании сыворотки больного с нитроцеллюлозной полоской, на которой нанесены пятна вирусных белков, заведомо разделенных при помощи электрофореза. Этапы иммуноблота схематично представлены на рисунке 13.3. После инкубации могут обнаруживаться антитела к конкретным вирусным белкам, которые можно идентифицировать иммуноферментным способом – аналогично ИФА.

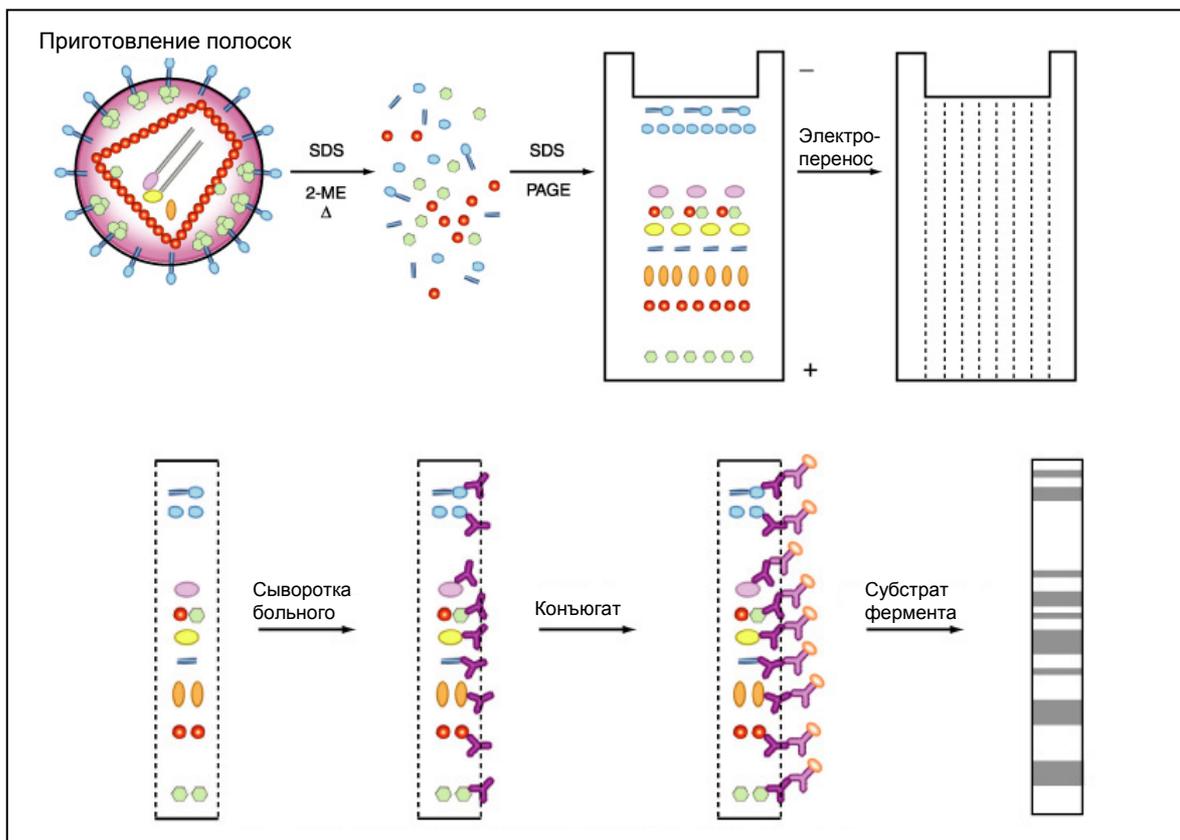
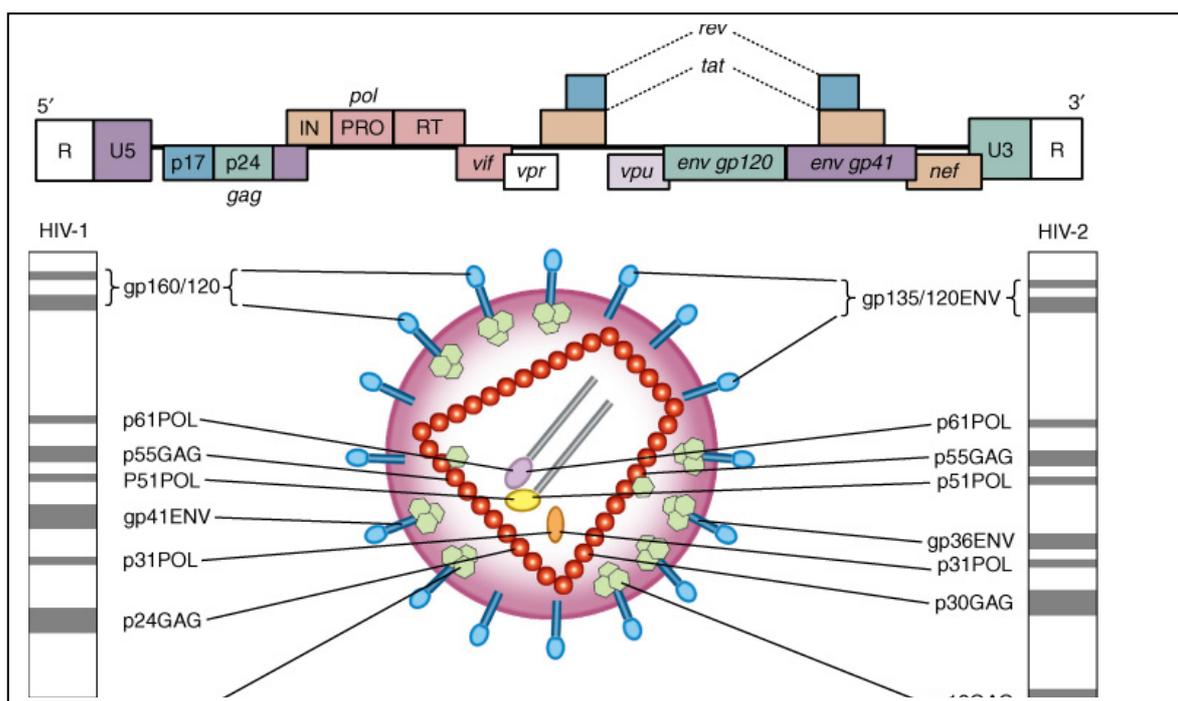


Рисунок 13.3. Иммуноблот для диагностики ВИЧ-инфекции. Очищенные вирионы разрушаются при помощи ионного детергента и восстанавливающего агента, подвергаются электрофорезу на додецил-полиакриламидном геле (SDS-PAGE), и переносятся на нитроцеллюлозную полоску. Затем полоски последовательно инкубируют с сывороткой, слюной или мочой больного, а также с иммуноглобулином G, конъюгированным с ферментом и субстратом фермента. По фермент-субстратной реакции судят о расположении отдельных вирусных белков (Займствовано из Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Sixth Edition, 2005, рисунок 115-5, стр 1514, Elsevier Inc.)

Рисунок 13.4. Система для проведения иммуноблота: прибор Sanofi для проведения иммуноблота



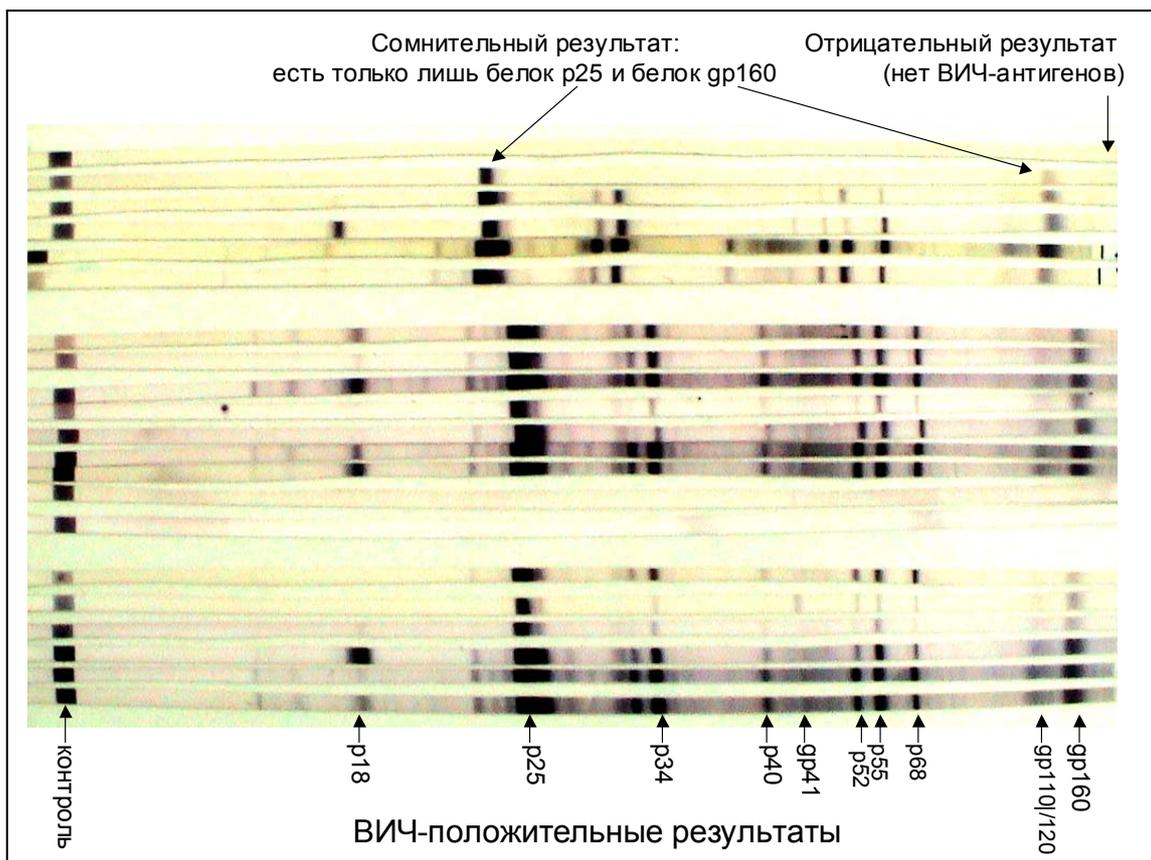
На рисунке 13.5, схематично представлено соответствие расположения полосок иммуноблота отдельным генам вируса ВИЧ-1 и ВИЧ-2.



**Рисунок 13.5. Белки вируса ВИЧ, определяемые при помощи иммуноблота. Показано расположение отдельных вирусных белков на полоске иммуноблота. Расположение каждого белка указано в соответствии с расположением генов экспрессирующих указанные белки. (Заимствовано из Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Sixth Edition, 2005, рисунок 115-6, стр 1515, Elsevier Inc.)**

Согласно Центру по Контролю Заболеваний США и Американской ассоциации директоров лабораторий штатов и территорий США, результат иммуноблота считается положительным при наличии положительных линий, соответствующих вирусным белкам p24/25, gp41 и gp120/160 (CDC, 1989). В случае отсутствия указанных линий, результат иммуноблота считается отрицательным. Кроме того, могут наблюдаться неопределенные результаты при наличии лишь одной или двух положительных линий. В таких случаях рекомендуется повторить иммуноблот через 1 месяц.

На рисунке 13.6 представлены результаты иммуноблота образцов крови, полученных от 21 человека с подозрением на наличие ВИЧ-инфекции. В частности, показаны нитроцеллюлозные полоски с разогнанными белками. Как видно, в большинстве случаев обнаруживались антигены ВИЧ, в частности белки p25, gp110/120 и gp160, наличие которых служит критерием подтверждения диагноза ВИЧ-инфекции. На самой верхней полоске не видно антигенов ВИЧ, что означает отсутствие ВИЧ-инфекции. На второй полоске сверху обнаруживается только лишь два антигена – p25 и gp160. В таких случаях диагноз ВИЧ-инфекции является сомнительным, и при этом рекомендуется повторить иммуноблот.



**Рисунок 13.6. Результаты иммуноблота: нитроцеллюлозные полоски с наличием и отсутствием антигенов ВИЧ (материалы любезно предоставлены лабораторией диагностики ВИЧ Республиканского центра СПИД Республики Казахстан, заведующая лабораторией Наталья Ковтуненко).**

Помимо иммуноблота, некоторые, хорошо оснащенные лаборатории предпочитают проводить другие высокочувствительные тесты, такие, как захват антигена р24 или полимеразная цепная реакция (см. ниже). Важно отметить, что иммуноблот является отличным подтверждающим тестом, но его ни в коем случае нельзя применять в качестве скринингового теста.

Так же, как и при ИФА, при выполнении иммуноблота могут наблюдаться ложноположительные результаты. Это, в частности, может иметь место при гипербилирубинемии, заболеваниях соединительной ткани, при поликлональной гаммапатии, а также при перекрестной реакции с другими вирусными антигенами (Bylund, Ziegner, Hooper, 1992). Очевидно, что такие ложноположительные реакции могут создавать определенные сложности в интерпретации диагноза. Принято считать, что доноры крови с повторяющимися неопределенными результатами иммуноблота в течение длительного времени являются неинфицированными вирусом ВИЧ. Больные с положительными результатами по ИФА, но с неопределенными результатами по иммуноблоту требуют продолжительного клинического и лабораторного мониторинга для того, чтобы подтвердить или исключить диагноз в последующем (Davey, Deyton, Metcalf, et al., 1992). При этом более информативным может оказаться использование полимеразной цепной реакции, которая позволяет непосредственно идентифицировать вирусную РНК или провирусную ДНК.

### 13.4 Определение ВИЧ-ассоциированных нуклеиновых кислот при помощи полимеразной цепной реакции

#### Определение провирусной ДНК

Провирусную ДНК можно определить при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для тестирования используют лимфоциты, выделенные из периферической крови и обработанные соответствующим образом в целях экстракции нуклеиновых кислот. ПЦР - это высокочувствительный метод, основанный на амплификации (усилении) небольшого сегмента провирусной ДНК при помощи специальных реагентов, называемых праймерами. Обычно амплификации подвергают участок ДНК, ответственный за кодирование стержневых белков вируса комплекса *gag*, а также LTR региона провирусной ДНК.

Одним из первых инструментов (амплификаторов), разработанных специально для ПЦР, являлся прибор фирмы Perkin Elmer, который долгое время применялся и применяется во многих научных лабораториях мира. В последнее время отмечается тенденция к коммерциализации метода и появилось множество достаточно простых в обращении амплификаторов. Наиболее распространенным коммерческим тестом, основанном на принципе полимеразной цепной реакции, является Amplicor assay, Roche Molecular Systems. Данный метод позволяет давать количественную оценку содержания провирусной ДНК. Кроме этого, существует множество других коммерческих тестов, основанных на принципах полимеразной цепной реакции.

В последнее время были разработаны методы определения провирусной ДНК в крови, высушенной на фильтровальной бумаге. Это позволяет собирать образцы крови в полевых условиях, длительное время их хранить, и затем, спустя несколько недель или даже месяцев, проводить тестирование в лабораторных условиях (Cassol S, Butcha A, Kinard S, et al., 1994; Behets, Kashamuka, Pappaioanou, et al., 1992; Cassol, Read, Weniger et al., 1996; Fortes, Menitove, Ross, 1989). Автору данной книги удалось эффективно применить данный подход во время крупномасштабного исследования эпидемии ВИЧ в Республике Мали (Западная Африка) в декабре 2000 года (Sharman, 2002; Pappas et al, 2002). На фотографиях (рис. 13.7) показано как производится забор капиллярной крови при помощи одноразового ланцета. Также представлены этапы сбора образцов крови на фильтровальную бумагу.

В целях использования крови, высушенной на фильтровальной бумаге, важно осуществить ее экстракцию при помощи специальных реагентов. Экстрагированную таким образом кровь можно использовать для тестирования различными методами. В частности, помимо ПЦР, можно проводить иммуноферментный анализ на наличие антител к вирусным антигенам. Ряд фирм выпускают коммерческие наборы, которые позволяют использовать высушенную кровь. В частности, тест-наборы Vironostika Organon Teknika содержат специальные реагенты (буферы), предназначенные для экстракции крови из фильтровальной бумаги. Теоретически, указанный принцип можно использовать и для других коммерческих тест-наборов. Однако важно при этом проводить контроль качества такой тест-системы по отношению к экспертным наборам.

Было бы ошибкой считать ПЦР идеальным и абсолютно точным методом тестирования на ВИЧ. Даже для системы Amplicor, представляющей собой «золотой стандарт» ПЦР диагностики, чувствительность составляет около 95 процентов и специфичность - около 98 процентов (Barlow, Tosswill, Parry, Clewley, 1997; Khadir,

Coutlee, Saint-Antoine, et al., 1995). Чувствительность при диагностике ВИЧ-инфекции у детей в возрасте до 2 лет варьирует от 75 до 97 процентов. Чувствительность еще ниже для детей в возрасте от 1 до 6 месяцев. Многие другие методы ПЦР диагностики значительно уступают системе Amplicor по чувствительности и специфичности.

Причины ложно-отрицательных результатов, как правило, кроются в контаминации на рабочем месте, а также связаны с неправильной лабораторной обработкой образцов. Кроме того, определенные проблемы могут быть обусловлены неудовлетворительным качеством праймеров и изначально низким количеством провирусных ДНК (Barlow, Tosswill, Parry, Clewley, 1997; Khadir, Coutlee, Saint-Antoine, et al., 1995; Bremer, Lew, Cooper, et al., 1996; Barlow, Tosswill, Clewley, 1995).

Лаборатории, использующие полимеразную цепную реакцию для определения провирусной ДНК, должны разработать систему внутреннего контроля для того, чтобы удостовериться в качестве диагностики. Обычно применяют специальные стандартизованные межлабораторные панели качества, на основании которых возможно удостовериться в минимализации ошибок тестирования (Defer, Agut, Gabarg-Chenon, et al., 1992; Jackson, Drew, Lin, et al., 1993).

В целом, важно отметить, что при условии правильного выполнения и отсутствия контаминации, ПЦР позволяет установить присутствие лишь одной молекулы провирусной ДНК в образце крови, содержащей от 10,000 до 100,000 лимфоцитов. Кроме того, в последнее время ПЦР применяется для определения резистентности против антиретровирусных препаратов.

#### Определение и количественная оценка РНК вируса ВИЧ

Для определения и количественной оценки РНК вируса ВИЧ применяется принцип полимеразной цепной реакции. Единственным отличием от стандартной ПЦР является использование обратной транскрипции для того, чтобы превратить вирусную РНК в ДНК. Для этого существует множество коммерческих тест-систем. Наиболее известными из них являются Amplicor Monitor assay (Roche Molecular Systems), NASBA (Organon Technika) и branched-chain DNA (Chiron). Наиболее широко применяемым методом, позволяющим количественно оценить содержание провирусной РНК (вирусную нагрузку), является система Amplicor Monitor assay. Этот метод применяется для мониторинга антиретровирусной терапии и прогнозирования клинического течения ВИЧ-инфекции. Метод используется некоторыми клиницистами для подтверждения диагноза ВИЧ-инфекции, особенно в тех ситуациях, когда положительный результат ИФА не подтверждается иммуноблотом. На рисунке 13.8 показан прибор (система Ампликор) для проведения количественной оценки вирусной нагрузки.

В таблице 13.1 представлены показания для оценки вирусной нагрузки, разработанные группой экспертов для Министерства здравоохранения США.

На рисунке 13.9 представлены результаты оценки вирусной нагрузки у 12 ВИЧ-инфицированных лиц. Как видно, высокий уровень вирусной нагрузки отмечался у больных под следующими номерами: 1 (более 600 тысяч копий провирусной РНК); 8 (около 400 тысяч копий провирусной РНК); и 12 (около 350 тысяч копий провирусной РНК).

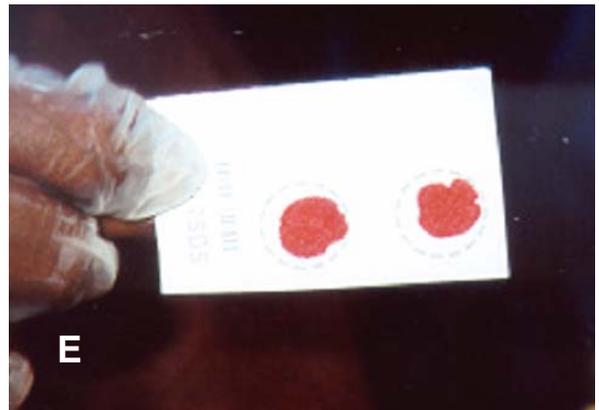


Рисунок 13.7. Этапы сбора крови для тестирования по методу крови, высушенной на фильтровальной бумаге (DBS method). А: одноразовый ланцет и необходимые материалы; В-С: забор капиллярной крови; D: сбор крови на фильтровальную бумагу; E: готовый образец крови, высушенной на фильтровальной бумаге (фотографии выполнены автором во время работы в Республике Мали в декабре 2000 года).



Рисунок 13.8. Прибор для оценки вирусной нагрузки (система Ампликор).

Таблица 13.1 Показания для оценки вирусной нагрузки. Заимствовано с изменениями из Руководства по применению антиретровирусных агентов у ВИЧ-1 инфицированных взрослых и детей, разработанного для Министерства здравоохранения США 6 октября 2005 года (Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1 Infected Adults and Adolescents, October 6, 2005).

Клинические показания	Информация	Применение
Симптомы острой вирусной инфекции	Диагностика - когда в крови не определяются антитела	Диагностика
Начальная оценка ВИЧ-инфекции	Базовый уровень вирусной нагрузки	В комплексе с оценкой CD4 клеток для решения о начале АРВ терапии
Каждые 3 – 4 месяца у пациентов, не принимающих АРВ терапию	Изменения вирусной нагрузки	В комплексе с оценкой CD4 клеток для решения о начале АРВ терапии
Через 2 – 8 недели после начала или изменения АРВ терапии	Начальная оценка эффективности лекарств	Для принятия решения о продолжении или изменении АРВ терапии
Через 3 – 4 месяца после начала АРВ терапии	Оценка эффекта АРВ терапии	Для принятия решения о продолжении или изменении АРВ терапии
Каждые 3 – 4 месяца пока больной получает АРВ терапию	Продолжительность антиретровирусного эффекта	Для принятия решения о продолжении или изменении АРВ терапии
Клинический случай или значительное снижение концентрации CD4 клеток	Связь с изменением или постоянной вирусной нагрузкой	Для принятия решения о продолжении, начале или изменении АРВ терапии

**Рисунок 13.9. Результаты оценки вирусной нагрузки у 12 ВИЧ-инфицированных (материалы любезно предоставлены лабораторией диагностики ВИЧ Республиканского центра СПИД Республики Казахстан, заведующая лабораторией Наталья Ковтуненко).**

AMPLILINK Report: A-ring Results				A-ring ID: 909951 All			InstrumentId : 38-4840	
T#	T	Sample ID	Test	Result	Unit	Flags	/ Comment	Finished
1	C	H	#HIM	6,10E+5	C/mL	---		07.06.02 1:12:36
				QS#: 72 Target: 3,800 3,800 *0,981 0,096				QS: *0,638 0,060
2	C	L	+HIM	1,27E+3	C/mL	---		07.06.02 1:19:48
				QS#: 72 Target: *0,827 0,088 0,010 0,003				QS: *1,734 0,191
3	C	N	-HIM	*,**		---		07.06.02 1:27:00
				QS#: 72 Target: 0,003 0,003 0,003 0,002				QS: 0,952 0,093
4	S		HIM	1,23E+4	C/mL	---		07.06.02 1:34:12
				QS#: 72 Target: 1,675 *0,203 0,023 0,005				QS: *0,493 0,050
5	S		HIM	1,64E+3	C/mL	---		07.06.02 1:41:24
				QS#: 72 Target: *0,549 0,057 0,007 0,003				QS: *0,911 0,090
6	S		HIM	1,19E+5	C/mL	---		07.06.02 1:48:36
				QS#: 72 Target: 3,801 *1,367 0,149 0,015				QS: *0,431 0,040
7	S		HIM	6,98E+4	C/mL	---		07.06.02 1:55:48
				QS#: 72 Target: 4,102 1,652 *0,199 0,017				QS: *0,912 0,090
8	S		HIM	3,96E+5	C/mL	---		07.06.02 2:03:00
				QS#: 72 Target: 4,103 3,802 *0,631 0,053				QS: *0,605 0,058
9	S		HIM	3,61E+4	C/mL	---		07.06.02 2:10:12
				QS#: 72 Target: 4,103 1,284 *0,161 0,013				QS: *1,335 0,138
10	S		HIM	3,33E+4	C/mL	---		07.06.02 2:17:24
				QS#: 72 Target: 3,802 *0,835 0,080 0,008				QS: *0,829 0,081
11	S		HIM	1,50E+5	C/mL	---		07.06.02 2:24:36
				QS#: 72 Target: 3,802 4,104 *0,941 0,085				QS: 2,058 *0,241
12	S		HIM	3,46E+5	C/mL	---		07.06.02 2:31:48

### 13.5 Определение вирусного антигена p24

Определение антигена p24 основано на принципах ИФА, только в данном случае иммобилизованным является не антиген, а моноклональные антитела, специфичные к p24. Данный принцип называется «захватыванием» антигена p24. Кроме того, в качестве проявляющих антител используются антитела класса IgG, являющиеся специфичными к антигену p24. Эти антитела конъюгируются с ферментом, по активности которого, и на основании цветовой окраски устанавливают наличие антигена p24 в образце крови подозреваемого больного. Причем считается, что интенсивность окрашивания прямо коррелирует с концентрацией вирусного антигена p24. Метод «захватывания» антигена p24 позволяет обнаруживать достаточно незначительные количества антигена p24-10 pg/ml. В последнее время стали доступными еще более чувствительные методы определения антигена p24, основанные на обнаружении иммунных комплексов (Bollinger RC Jr, Kline RL, Francis HL, et al., 1992).

Антиген p24 обнаруживается в сыворотке или плазме больного во время острой фазы ВИЧ-инфекции, а также в поздний период заболевания. Только лишь у 4 процентов асимптоматических больных обнаруживается данный антиген. Эта пропорция увеличивается до 70 процентов у больных с развившимися клиническими симптомами СПИДа (Bylund, Ziegner, Hooper, 1992).

Определение антигена p24 также необходимо для диагностики вертикальной передачи ВИЧ от матери к плоду, поскольку определение антител в данном случае является бессмысленным ввиду их пассивной передачи. Однако чувствительность данного метода для диагностики вертикальной передачи оставляет желать лучшего и составляет лишь от 50 до 70 процентов, хотя специфичность метода достаточно высока – 95 процентов. Чувствительность метода еще ниже (от 0 до 20 процентов) у младенцев с асимптоматической формой инфекции, а также у младенцев в возрасте до 6 месяцев. У детей с обнаруженным антигеном p24, более вероятно развитие клинических симптомов ВИЧ-инфекции (Borkowsky, Krasinski, Paul, et al., 1989; Andiman, Silva, Shapiro, et al., 1992; Burgard, Mayaux, Blarcke, et al., 1992).

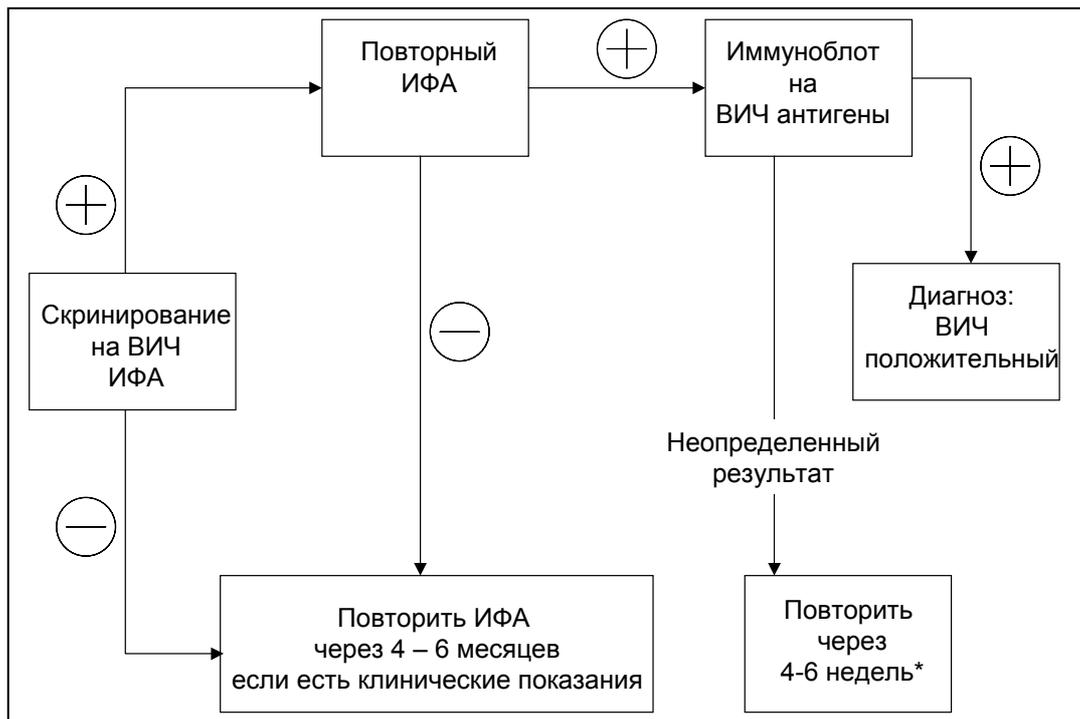
Ранее определение антигена p24 использовалось в целях мониторинга антиретровирусной терапии. Однако в последнее время метод оказался вытесненным другим, более чувствительным методом, – полимеразной цепной реакцией, при помощи которой можно устанавливать и наблюдать за изменениями вирусной нагрузки в зависимости от эффективности антиретровирусной терапии.

### **13.6 Алгоритм лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции**

Диагностика ВИЧ-инфекции в значительной степени зависит от оснащенности лабораторий и поставленных целей и задач. Ниже представлены алгоритмы лабораторной диагностики, рекомендованные для лабораторий, оснащенных иммуноблотом и другими точными методами, а также алгоритмы, рекомендованные для лабораторий с ограниченными возможностями.

#### Алгоритм, рекомендованный для лабораторий, оснащенных иммуноблотом

На рисунке 13.10 представлен алгоритм лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции, который применяется в лабораториях, имеющих возможности для проведения как стандартного ИФА, так и иммуноблота. При подозрении на ВИЧ, вначале проводится тестирование при помощи ИФА. Если результат оказывается отрицательным, то, обычно, исключают ВИЧ-инфекцию. Однако, в ряде случаев бывает необходимым проводить повторное тестирование при помощи ИФА или других, более точных методов. Это бывает, например, необходимым, если есть уверенность в том, что подозреваемый находился в контакте с ВИЧ-инфицированным в течение последних 3 месяцев. Кроме того, существуют важные клинические показания, такие, как оппортунистические инфекции, указывающие на необходимость уточнения диагноза.



**Рисунок 13.10.** Алгоритм диагностики ВИЧ-инфекции для лабораторий, оснащенных ИФА и иммуноблотом. \*При стабильном неопределенном результате в иммуноблоте через 4-6 недель, диагноз ВИЧ считается отрицательным. Однако при клинических показаниях рекомендуется повторить иммуноблот через 3 месяца. Альтернативный подход – провести анализ на антиген p24 или полимеразную цепную реакцию (Заимствовано с изменениями из Fauci and Lane 2000).

Если результаты ИФА оказываются положительными или неопределенными, показано повторение тестирования. Если при двух повторных тестах результаты окажутся отрицательными, делают заключение о том, что первоначальный результат был ложно-положительным, и диагноз ВИЧ-инфекции исключают. Если же повторные результаты оказываются положительными, необходимо проводить углубленное исследование при помощи иммуноблота. Если иммуноблот окажется положительным, то ставится диагноз ВИЧ-инфекции. При отрицательном результате иммуноблота дается заключение о том, что данные иммуноферментного анализа были ложно-положительными, и наличие ВИЧ-инфекции исключается. В случае неопределенного результата иммуноблота, рекомендуется его повторить через 1 месяц. Иногда целесообразным является проведение других высокочувствительных тестов – таких, как определение антигена p24, или ПЦР. При отрицательном повторном иммуноблоте, и других тестах, диагноз ВИЧ-инфекции исключается. В случае же положительного результата одного из тестов, ставится временный диагноз ВИЧ-инфекции, который впоследствии требует подтверждения при помощи иммуноблота.

#### Алгоритм лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции, рекомендованный для лабораторий с ограниченными возможностями

Объединенная программа ООН по борьбе с ВИЧ/СПИД (ЮНЭЙДС) совместно с Всемирной Организацией Здравоохранения разработали методические подходы, применимые для лабораторий с ограниченными диагностическими возможностями (UNAIDS and WHO, 1997). Выбор этих методических подходов определяется целями

диагностического исследования, требованиями к чувствительности и специфичности теста, а также распространенностью ВИЧ-инфекции среди лиц, подвергающихся тестированию. Они не требуют использования дорогостоящих методов исследования и основываются на использовании стандартных тестов иммуноферментного анализа или, иногда, экспресс-методов диагностики. Принципы этих рекомендаций представлены в таблице 13.2, и описаны ниже.

**Таблица 13.2 Рекомендации ЮНЭЙДС и ВОЗ по тестированию на ВИЧ**

Цель	Распространенность	Методические подходы
Скринирование	Массовое	1
Эпиднадзор	>10%	1
	≤10%	2
Диагноз при наличии симптомов	>30%	1
	≤30%	2
Диагноз при асимптоматических случаях	>10%	2
	≤10%	3

Методический подход 1 заключается в применении лишь одного чувствительного скринингового теста (ИФА). Он рекомендуется для скринирования крови, а также для эпиднадзора в тех регионах, где ожидается высокая распространенность ВИЧ-инфицирования (выше 10 процентов).

Методический подход 2 основан на использовании двух скрининговых тестов. Если первый тест оказывается положительным, то применяется второй тест, и при этом исследуемый материал считается положительным на наличие ВИЧ-инфекции, если оба теста оказываются положительными. Данный подход рекомендуется для эпиднадзора в регионах, где распространенность ВИЧ-инфекции составляет ниже 10 процентов, для диагностики ВИЧ-инфекции при наличии клинической симптоматики и распространенности ВИЧ-инфекции ниже 30 процентов, а также в асимптоматических случаях при распространенности инфекции выше 10 процентов.

Методический подход 3 требует использования трех тестов. При этом образец считается положительным на наличие ВИЧ-инфекции, если все три теста оказываются положительными. Этот подход рекомендуется для диагностики ВИЧ-инфекции у лиц без симптомов ВИЧ, когда распространенность инфекции в данной популяции составляет менее 10 процентов.

### **13.7 Экспресс-методы и новые подходы в диагностике ВИЧ-инфекции**

#### Экспресс-методы

В последнее время большую популярность приобретают экспресс-методы диагностики, основанные на принципах иммуноферментного анализа. В большинстве случаев результаты могут стать доступными в течение 10-15 минут. Как и в случае со стандартным ИФА, экспресс-методы также нуждаются в подтверждении либо более чувствительными и специфичными ИФА тестами, либо при помощи иммуноблота (Kassler, Haley, Jones, et al., 1995; Zaw. et al., 1999; Giles, Perry, Parry, 1999; Irwin, Olivo, Schable et al., 1996; Kane, 1999).

Методы экспресс-диагностики ВИЧ могут быть сгруппированы в три основные категории: 1) методы, основанные на проточном принципе, 2) агглютинационные методы и 3) методы, основанные на капиллярном потоке (Branson, 2000).

Проточные методы требуют присоединения вирусного антигена к мембране или маленьким частицам (рис. 13.11). Они, обычно, требуют определенных действий по добавлению образца, конъюгата и индикаторного реагента, необходимого для проявления реакции. Положительную реакцию можно видеть невооруженным глазом.

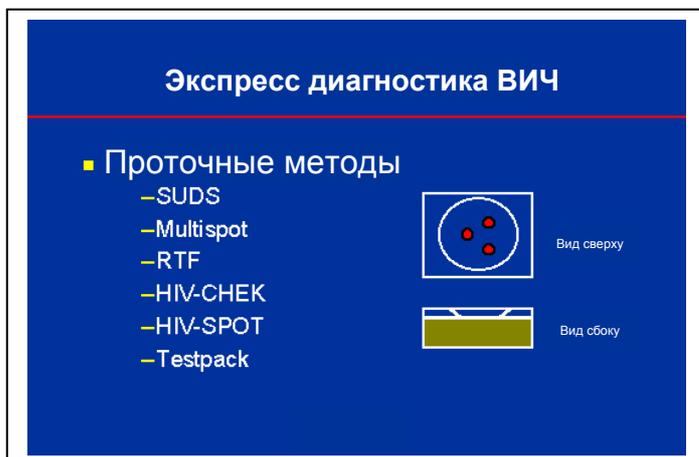


Рисунок 13.11. Экспресс-методы диагностики ВИЧ, основанные на проточном принципе (Займствовано из Branson, 2000).

Методы, основанные на принципе агглютинации, заключаются в том, что антитела к вирусным антигенам связываются с частицами, покрытыми антигенами вируса ВИЧ (рис.13.12). В результате происходит агглютинация (склеивание) этих частиц, которые также можно легко обнаружить невооруженным глазом.



Рисунок 13.12 Экспресс-методы диагностики ВИЧ, основанные на принципе агглютинации. (Займствовано из Branson, 2000).

Наиболее современные тест-системы основаны на принципе капиллярного потока. При этом вирусные антигены конъюгируются с коллоидным золотом или селеном (рис.13.13). Для проведения тестирования достаточно нанести каплю крови или исследуемой жидкости на абсорбируемую полоску, содержащую все необходимые реагенты и конъюгаты. Затем происходит поток образца по полоске, и при наличии противовирусных антител развивается цветовая реакция, по которой судят о наличии вируса в исследуемом образце. В данном методе используется дополнительная контрольная линия для того, чтобы удостовериться в адекватности потока исследуемого образца и правильности проведенного теста. Результаты могут быть доступными в течение 10-15 минут. При этом наличие единственной контрольной

полоски свидетельствует об отрицательном результате, а обнаружение двух полосок – о положительном результате.



Рисунок 13.13.

Экспресс-методы диагностики ВИЧ, основанные на принципе капиллярного потока (Заимствовано из Branson, 2000).

### Исследование слюны и слизистого трансудата ротовой полости

В последние годы большую популярность получает тестирование слюны и слизистого трансудата ротовой полости на ВИЧ. Такие тесты основаны на принципах комбинированного ИФА и иммуноблота, и они обладают достаточно высокой чувствительностью и специфичностью (Frerichs, Htoon, Eskes, Lwin, 1992; Pasquier, Bello, Gourney, et al., 1997; Saville, Constantine, and Hansen, 1997; Schramm, Angulo, Torres, et al., 1999).

Для сбора образцов слюны и слизистого трансудата ротовой полости применяют специально обработанный ватный тампон, намотанный на нейлоновый стержень. Такое приспособление помещают в ротовую полость исследуемого человека и движениями, напоминающими чистку зубов, собирают образец, который затем помещают в специальную пробирку, содержащую раствор с консервантом и необходимыми реагентами. По изменению окраски этих растворов или окраски самого тампона с образцом, судят о наличии или отсутствии ВИЧ-инфекции. Кроме того, содержимое пробирок можно направлять в вирусологическую лабораторию для определения антител при помощи ИФА.

В настоящее время доступно множество коммерческих тест-систем, основанных на описанном выше принципе. Наиболее популярными являются OraSure HIV-1 Oral Specimen Collection Device (Epitope, SmithKline Beecham) и Omni-SAL (Saliva Diagnostic Systems; Vancouver, WA). Системы ИФА, приспособленные для тестирования слюны и слизистого трансудата, включают такие, как GAC ELISA (IgG antibody capture ELISA) and GAC RIA (IgG antibody capture radioimmunoassay). Указанные тест-системы характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью - около 99 процентов (Emmons, Paparello, Dreker, et al., 1995; Emmons, 1997; Gallo, George, Fitchen, et al., 1997).

### Исследование мочи

При исследовании мочи можно определять антитела к структурным вирусным белкам p24, gp41 и gp36. При этом можно применить так называемый “дот-блот эссэй”, а также иммуноферментный анализ с помощью коммерческих тест-систем Wellcozyme

HIV1+2 GACELISA. Чувствительность ИФА мочи составляет 97 процентов, а специфичность – 100 процентов (Urnovitz, Sturge, Gottfried, Murphy, 1999).

В таблице 13.3 представлены основные категории тестирования на ВИЧ с кратким описанием предметов тестирования, параметров и условий применения, а также возможности определения вируса ВИЧ-2. В таблице 13.4 представлены методы тестирования на ВИЧ, применяемые для установления наличия вируса в различных биоматериалах.

**Таблица 13.3 Категории тестирования на ВИЧ. (Заимствовано с изменениями из Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Sixth Edition, 2005, таблица 115-1, Elsevier Inc.**

Категории тестирования	Синонимы и сокращения	Предмет тестирования	Описание/применение
Скринирование	Начальное тестирование	IgG и IgM	Предварительная идентификация ВИЧ-инфекции
Иммуноферментный анализ	ИФА, РИА	IgG и IgM	Стандартное скринирование спектрофотометрическим методом
Простой	ИФА, РИА	IgG и IgM	Не требует специального оборудования
Экспресс	ИФА, РИА	IgG и IgM	Результаты доступны в течение 10-30 мин
Простой/экспресс	П/Э	IgG и IgM	Результаты доступны в течение 10-30 мин и не требует специального оборудования
Агглютинация частиц	АЧ	IgG и IgM	ИФА основанный на визуальной оценке слипания частиц
Захват антигена	Определение p24	P24	Определение антигена ВИЧ
Диссоциация иммунного комплекса	ДИК	P24	Метод основанный на разрушении комплекса p24 – анти p24
Подтверждающий анализ	Доп. тестирование	IgG	Подтверждающий метод
Иммуноблот	ИБ	IgG	Подтверждающий метод
Иммунофлюоресценция	ИФ	IgG	Подтверждающий метод
Анализ нуклеиновых кислот		Нуклеиновые кислоты ВИЧ	
NAT	NAT	РНК ВИЧ	Использование полимеразной цепной реакции - ПЦР
Определение РНК ВИЧ	РНК вирусная нагрузка	РНК ВИЧ	Применяется для оценки тяжести и степени развития инфекции
Определение ДНК ВИЧ	ДНК провирусная нагрузка	ДНК ВИЧ	Основан на ПЦР и применяется для неонатологической диагностики
Сбор биоматериалов на дому		IgG	Сбор биоматериалов производится вне медицинского учреждения, а тестирование – в лаборатории
Тестирование на дому		IgG	Сбор биоматериалов и тестирование производятся вне медицинского учреждения

**Таблица 13.4** Методы тестирования различных биоматериалов на ВИЧ (Заимствовано из *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Sixth Edition, 2005, таблица 115-3, Elsevier Inc.*

Биоматериалы	ИФА	Экспресс ИФА	Иммуно-блот	Непрямая иммуно-флуоресценция	Захват антигена p24
Цельная кровь	×	×			
Высушенная кровь	×				
Плазма	×	×	×	×	×
Сыворотка	×	×	×	×	×
Слюна	×		×		
Моча	×		×		
Сборная кровь	×				
Трупная сыворотка	×				

### 13.8 Субтипирование вируса ВИЧ

Как указывалось в главе 5, вирус ВИЧ-1 подразделяется на три основных генетических типа – М, О и N (non-M, non-O). Тип М в дальнейшем подразделяется на 10 различных подтипов, обозначаемых буквами латинского алфавита: А–D, F–H, J, и К. Подтипы вируса различаются между собой в зависимости от нуклеотидной последовательности генов *env* (30 процентов) и генов *gag* (14 процентов). Следует отметить, что внутри подтипов А и F выделяются дополнительные разновидности, обозначаемые как А1 и А2, а также F1 и F2 (Thomson, Delgad, Manjón, et al., 2001; Delgado, Thomson, Villahermosa, et al., 2002; Esteves, Parreira, Venenno, et al., 2002).

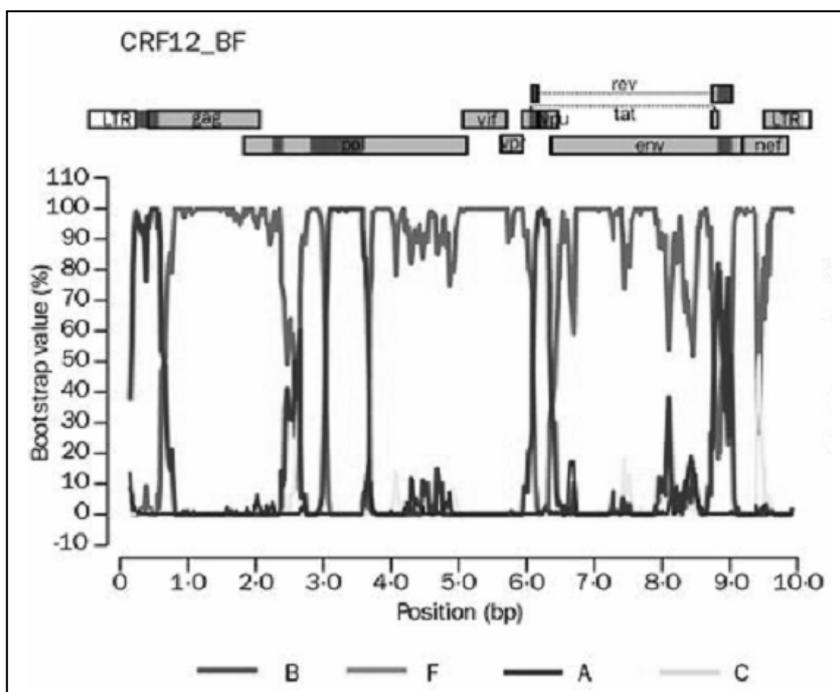
Знание подтипов вируса имеет значение для понимания эпидемиологии его распространения, а также для подбора оптимальной терапии, и в будущем, для разработки целенаправленной вакцинации. Процесс установления подтипов вируса называется его субтипированием. Оно требует выделения лимфоцитов из крови ВИЧ-инфицированного, затем выделения фракции нуклеиновых кислот и применения сложных молекулярно-биологических методов, таких, как гетеродуплексное исследование и секвенирование. Последний метод является более точным, хотя и достаточно дорогим и трудоемким.

Выделение лимфоцитов – это не сложный процесс, который требует применения специального реагента – фиколла, обеспечивающего необходимый градиент плотности. Кровь больного наслаивается на фиколл и центрифугируется в течение 20 минут со скоростью 1400 оборотов в минуту. После центрифугирования лимфоциты образуют кольцо белесоватого цвета, которое выделяется из пробирки и в последующем отмывается в физиологическом растворе. На рисунке 13.14 показана пробирка с фиколлом, а также пробирка с белесоватым кольцом лимфоцитов после центрифугирования на градиенте плотности. Выделенные таким образом лимфоциты можно использовать для экстракции РНК и последующего генетического субтипирования (анализа нуклеотидной последовательности). Также лимфоциты можно изучить при помощи проточной цитометрии на содержание мембранных маркеров CD4 и CD8, в целях определения степени иммунодефицита (см. следующий раздел 13.9).



**Рисунок 13.14.**  
 Слева: пробирка с фиколлом;  
 справа: кольцо лимфоцитов после  
 центрифугирования крови на  
 градиенте плотности фиколла.

Помимо основных генетических подтипов, существуют так называемые рекомбинантные формы, которые произошли в результате множественного инфицирования двумя или более подтипами вируса, например, подтипами А и В, или В и С. Такие рекомбинантные формы вируса обозначаются как циркулирующие рекомбинантные формы - CRFs (circulating recombinant forms) (Robertson, Anderson, Bradač, et al., 1999; Peeters, 2000). Их можно установить при помощи методов секвенирования, а также использования специального компьютерного анализа (bootscan), который позволяет идентифицировать рекомбинации генов. На рисунке 13.15 показана гистограмма, полученная по принципу bootscan, при помощи которой можно идентифицировать рекомбинантные формы вируса.



**Рисунок 13.15.** Гистограмма рекомбинантного подтипа вируса ВИЧ CRF12\_BF, полученная на принципе метода Bootscan. Заимствовано с разрешения Elsevier Science из Thomson, Pérez-Álvarez, and Nájera, *The Lancet*, 2002, Volume 2, Number 8).

### 13.9 Диагностика СПИДа и мониторинг антиретровирусной терапии

Клинико-лабораторный диагноз Синдрома приобретенного иммунодефицита, который представляет собой конечную стадию ВИЧ-инфекции, устанавливают при следующих показателях: содержании CD4+ лимфоцитов ниже 200 клеток на микролитр крови, а также при наличии одного или нескольких оппортунистических состояний. К оппортунистическим состояниям относят такие, как саркома Капоши, пневмония, вызванная *Pneumocystis Carinii*, туберкулез и др. Следовательно, для диагностики Синдрома приобретенного иммунодефицита важно оценивать содержание CD4 положительных лимфоцитов. Кроме того, в целях оценки клинического течения болезни и мониторинга антиретровирусной терапии, важно определять степень вирусной нагрузки.

1. Содержание CD4+ лимфоцитов можно установить иммунофлюоресцентным методом, благодаря использованию антител, специфичных к CD4 маркеру лимфоцитов и конъюгированных с флюоресцентным красителем. Клетки, несущие маркер CD4, связанные с флюоресцентными антителами, можно увидеть и подсчитать при помощи флюоресцентного микроскопа. Однако наилучшим методом количественного определения таких лимфоцитов является проточная цитофлюорометрия. Ниже представлено детальное описание метода проточной цитофлюорометрии.
2. Определение вирусной нагрузки проводят путем определения количества частиц вирусной РНК. Это можно осуществить при помощи полимеразной цепной реакции, основанной на обратной транскрипции вирусной РНК, и проведения множества циклов амплификации. В настоящее время применяются автоматические амплификаторы, такие, как Ампликор фирмы Roche Laboratories.

Проточную цитофлюорометрию и оценку вирусной нагрузки относят к трудоемким и дорогостоящим методам. Их применение рекомендуется только лишь для незначительного числа лабораторий, укомплектованных соответствующим оборудованием и подготовленным персоналом. Очевидно, что, при наличии незначительного числа больных СПИДом, не имеет смысла тратить средства на закупку ПЦР амплификатора или проточного цитофлюориметра, и можно ограничиться лишь иммуноферментным анализом. В то же время, проведение эффективной и рациональной антиретровирусной терапии невозможно без мониторинговой оценки концентрации CD4 лимфоцитов и вирусной нагрузки.

#### 13.10 Проточная цитофлюорометрия

Проточная цитофлюорометрия - это метод, позволяющий измерять подвижность клеток в жидкой среде и устанавливать их свойства. Наиболее близкой аналогией проточной цитофлюорометрии является микроскопия. Большинство микроскопов и проточных цитофлюориметров (их еще называют проточниками) имеют ряд общих характеристик, таких, как наличие источника света, оптических линз и фильтров.

Источник света. В обычном микроскопе источником света является лампочка, предназначенная для освещения клеток. В проточном цитофлюориметре источником света является луч лазера. Применение лазера обусловлено тем, что он обеспечивает концентрированный и интенсивный поток монохромного (одноцветного) света. Монохромный характер света является важным условием, обеспечивающим

«возбуждение» и оптимальное измерение так называемого флюоресцентного свечения.

Флюоресценция - это способность молекул поглощать монохромный свет определенной длины волны (например, луч лазера) и испускать свет более широкой длины волны. Изменение длины волны обусловлено потерей энергии в процессе поглощения и испускания света, который характеризуется, как «возбуждение». Свет, испускаемый такой «возбужденной» молекулой, носит название флюоресцентного свечения. Существует ряд химических веществ, которые обладают свойством флюоресцентного свечения. К таким веществам относятся FITC, испускающий зеленый свет, и акридиновый оранжевый, испускающий оранжевый свет. Они широко применяются в проточной цитофлюориметрии. Например, если окрасить моноклональные антитела к CD4-рецептору лимфоцитов краской FITC, то, присоединившись к данным рецепторам, указанные антитела придадут клеткам свойство флюоресцентного свечения. Причем, в данном случае клетки будут способны испускать флюоресценцию зеленого цвета. В проточном цитофлюориметре это происходит тогда, когда лимфоциты проходят в потоке жидкости через луч лазера, который «возбуждает» только лишь те клетки, которые имеют на своей поверхности CD4-рецепторы с прикрепленными к ним моноклональными антителами, окрашенными флюоресцентным красителем FITC. Именно эти клетки способны испускать флюоресцентный свет, который можно регистрировать при помощи специальных фильтров, разделяющих луч лазера от флюоресцентного света. Специальные расчеты затем позволяют количественно определить концентрацию этих флюоресцирующих клеток, а именно их количество на 1 микролитр крови. Именно таким образом определяют стадию развития ВИЧ-инфекции на основе концентрации CD4-клеток в крови – если она составляет менее 200 клеток в микролитре крови.

Поле зрения. В микроскопе поле зрения является статическим. Это требует горизонтального перемещения объектива микроскопа, для того, чтобы разглядеть множество полей зрения. В проточной цитофлюориметрии поле зрения является динамичным. В отличие от объектива микроскопа, клетки перемещаются в потоке жидкости, продвигаемой под давлением воздуха. Это позволяет пропускать большое количество клеток через луч лазера. В связи с указанной характеристикой, данный метод называется *проточной* цитофлюориметрией.

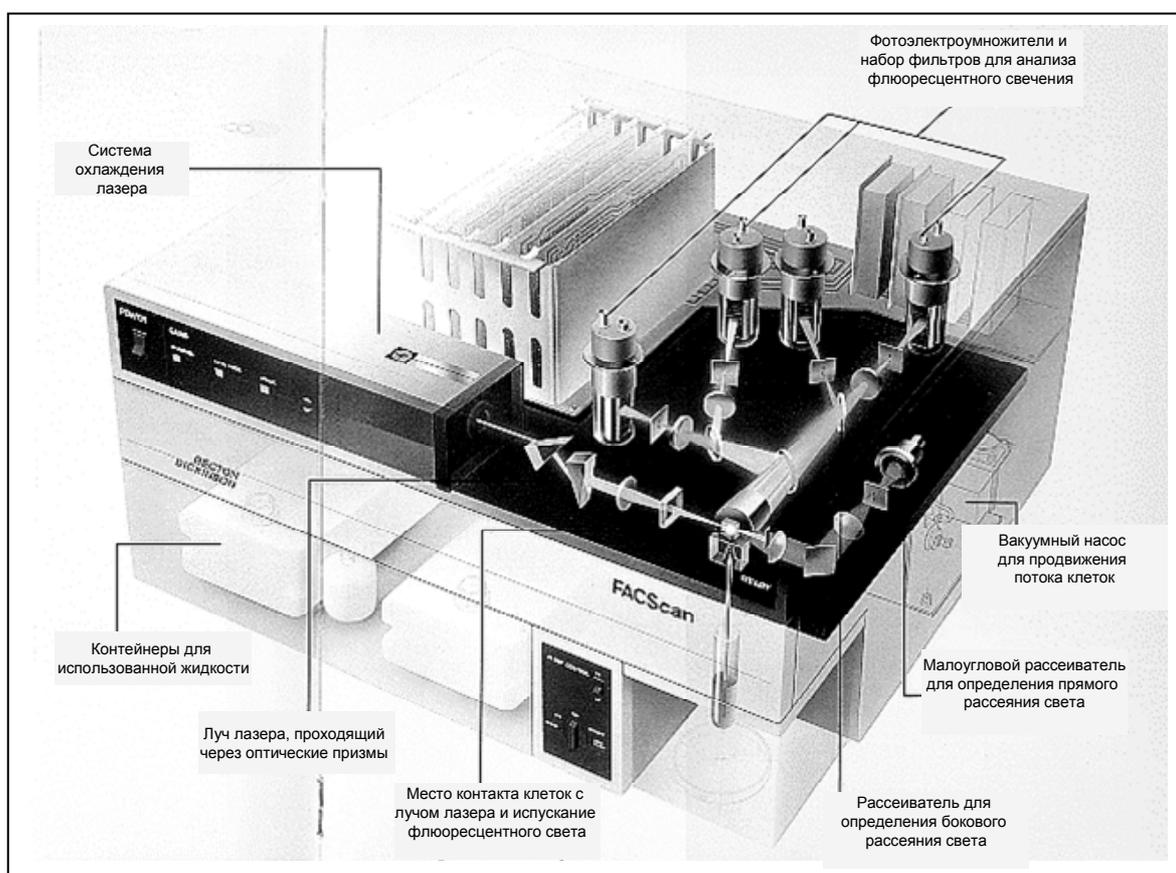
Оптические линзы. Как в микроскопе, так и в проточном цитофлюориметре, свет, отражаемый клетками, наблюдается через оптические линзы.

Фильтры. Для того чтобы регистрировать или наблюдать за специальными цветовыми характеристиками клеток, некоторые световые микроскопы снабжены специальными фильтрами. Наличие таких фильтров, в частности, важно для флюоресцентной микроскопии. Как указывалось выше, фильтры играют важную роль, дифференцируя свет-возбудитель (луч лазера) от света, испускаемого флюоресцентным красителем. В проточной цитофлюориметрии свет испускают клетки, окрашенные флюоресцентным красителем, и движущиеся в потоке жидкости.

Детекторы. В обычной микроскопии детектором является сам наблюдатель – лаборант или врач. В проточной цитофлюориметрии в качестве детектора применяется сложное устройство, которое называется фотоэлектроумножителем. Это устройство должно обладать способностью регистрировать кратковременные

«вспышки» флюоресцентного света, испускаемого в процессе прохождения через луч лазера нескольких тысяч окрашенных клеток, за мгновение.

Рассеяние света. Свет при соприкосновении с твердыми частицами имеет свойство рассеиваться. Степень рассеивания зависит от того, насколько велики размеры данной частицы. При контакте с клетками малых размеров рассеяние света незначительно. В то время как при контакте с большими частицами степень рассеяния увеличивается. Соответственно, рассеиваемый свет можно видеть как прямо напротив клеток (для малых частиц), так и по бокам (для больших частиц). На этом принципе основана функция проточной цитофлюориметрии, которая позволяет различать клетки малых размеров (лимфоциты) от больших клеток (нейтрофилов). При этом лимфоциты определяются с помощью детекторов прямого рассеяния луча лазера, а нейтрофилы - с помощью детекторов бокового рассеяния луча лазера. Выделенные таким образом, и окрашенные при помощи флюоресцентного красителя лимфоциты можно хорошо видеть на экране проточного цитофлюориметра.



**Рисунок 13.16** Иллюстрация принципа работы проточного цитофлюориметра FacScan компании Becton Dickinson.

На рисунке 13.16 представлена иллюстрация принципа работы проточного цитофлюориметра FacScan компании Becton Dickinson. В левой части рисунка показана охлаждаемая лазерная установка, которая образует луч лазера. Тестовая пробирка содержит суспензию клеток, которые при помощи вакуумного насоса попадают в проточную трубку. При этом они сталкиваются с лучом лазера. В результате столкновения с клетками, луч лазера рассеивается. Малоугловое и боковое рассеяние луча лазера определяются при помощи соответствующих детекторов, которые позволяют дифференцировать клетки малых размеров (лимфоциты с

малоугловым рассеянием) от больших клеток (нейтрофилов с боковым рассеянием). Кроме того, результатом контакта луча лазера с клетками, окрашенными флюоресцентным красителем, является флюоресцентное свечение. Оно усиливается при помощи фотоэлектроумножителей, и определяется при помощи специальных детекторов. Таким образом, регистрируются клетки, несущие, например, CD4-рецепторы. Вся информация от детекторов поступает в компьютер (не показан на рисунке), который позволяет анализировать данные и представлять их в нужном формате.