

Микробиологическая диагностика ВИЧ-инфекции и СПИД -ассоциированных заболеваний

Шевченко Н.И.

Вопросы, разбираемые на лекции

- 1. Особенности строения и репродукции вируса иммунодефицита человека.
- 2. Пермиссивные для вируса клетки человеческого организма.
- 3. Стадии течения инфекции в инфицированном организме.
- 4. Механизмы противовирусного действия основных лекарственных препаратов, применяемых для лечения ВИЧ-инфекции. Методы мониторинга эффективности терапии.
- 5. Основные возбудители оппортунистических инфекций. Лабораторная диагностика основных вирусных и грибковых оппортунистических инфекций.

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ, HIV)

- вызывает заболевание, которое называется ВИЧ-инфекцией .
- ВИЧ-инфекция – инфекционный процесс в организме человека, вызываемый вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), характеризующийся медленным течением, поражением иммунной и нервной систем, последующим развитием на этом фоне оппортунистических инфекций, новообразований, приводящих инфицированных ВИЧ к летальному исходу.



Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ, HIV)

- **СПИД** – терминальная фаза ВИЧ-инфекции, наступающая в большинстве случаев через весьма длительный период с момента заражения вирусом. Поэтому правильно говорить не вирус СПИДа, а вирус ВИЧ.

Этиология

- Вирус иммунодефицита человека относится к группе ретровирусов. В настоящее время выделены два типа вируса – ВИЧ-1 и ВИЧ-2, различающиеся по структурным и антигенным характеристикам. Инфекция, вызванная ВИЧ-2, характеризуется более длительным течением.

Этиология

- Вирус HTLV- 4, выделенный американскими учеными от представителей групп повышенного риска (Сенегал), распространен в основном в Африке.

Этиология

- В настоящее время выделяют субтипы вируса, обозначаемые заглавными буквами латинского алфавита А-Н, О и т.д. Возможно одновременное существование в организме человека ВИЧ- 1, ВИЧ-2, HTLV- 4 в различных сочетаниях.

Изменчивость вируса

- Главное свойство ВИЧ - гетерогенность. Фенотипическая вариабельность ВИЧ отражает неоднородность его генофонда : все ВИЧ- изоляты в большей или меньшей степени различаются по структуре (нуклеотидной последовательности) РНК.

Изменчивость вируса

- Отличаются не только штаммы от разных людей, но и клоны, выделяемые по ходу инфекционного процесса. На каждый репликативный цикл у ВИЧ приходится не менее десятка мутаций, а вариабельность его генома на несколько порядков выше, чем у вируса гриппа А.

Изменчивость вируса

- Для ретровирусов используется понятие квазивидов, подразумевающее, что уже первое потомство отличается от родителей. Это означает, что ВИЧ существует в виде популяций, состоящих из множества такого рода вариантов. Даже при бессимптомной инфекции ВИЧ подвергается непрерывной репликации, создавая мобильное потомство, готовое противостоять экологическому прессу хозяина.

Изменчивость вируса

- Особенно демонстративны эпитопные перестройки главного поверхностного антигена gp120. В его структуре имеется несколько гипервариабельных доменов, подверженных высокой изменчивости.

Изменчивость вируса

- На этой основе формируются варианты ВИЧ, которым не страшны антитела и цитотоксические CD- 8 Т- лимфоциты. Выживание таких ускользающих мутантов – один из главных механизмов ВИЧ-персистенции и камень преткновения на пути создания вакцин.

Эпидемиология

- ВИЧ-инфекция относится к категории антропонозов с парентеральным, контактным (половым) и вертикальным (трансплацентарным) механизмом передачи возбудителя.
- Источником инфекции является инфицированный человек в любой стадии ВИЧ-инфекции. Наибольшие концентрации вируса содержатся в крови, сперме, грудном молоке, спинномозговой жидкости.

Эпидемиология

- При всех видах половых контактов существует риск передачи ВИЧ-инфекции. Степень риска зависит от ряда факторов :
- принадлежность полового партнера к уязвимой группе, т.е. вероятность того, что половой партнер инфицирован
- вид полового контакта
- стадия заболевания инфицированного партнера
- уровень вирусной нагрузки
- наличие инфекций, передающихся половым путем
- генетическая восприимчивость

Эпидемиология

- Восприимчивость мужчин и женщин к ВИЧ-инфекции практически одинакова. При гетеросексуальных связях заражение женщин наступает чаще.

Эпидемиология

- Вертикальный путь передачи от матери плоду происходит:
- антенатально – трансплацентарно от ВИЧ-инфицированной матери;
- - интранатально – через повреждения на коже, при контакте с инфицированной кровью или выделениями матери или при заглатывании материнской крови, или других биологических жидкостей;
- инфицирование ребенка происходит также при вскармливании грудью или грудным молоком ВИЧ-инфицированной матери.

Патогенез

- Попадая в организм, вирус очень быстро размножается в клетках моноклеарной системы периферической крови. Возникает виремия. Проникновение ВИЧ в клетки мишени человека осуществляется с помощью поверхностных рецепторов (gp-120 и gp-41), обладающих комплементарностью к клеткам хозяина, поверхность которых снабжена белком-рецептором (CD-4).

Патогенез

- Сюда относятся: Т-лимфоциты-хелперы, моноциты-макрофаги, клетки Лангерганса, нейроглиальные клетки ЦНС, лимфоэпителиальные клетки кишечника, эндотелиоциты. Специфически адсорбируясь на поверхности клеток, освободившись от оболочки, проникает внутрь, где освобождается вирусная РНК. С помощью обратной транскриптазы вирусная РНК «переписывается» в ДНК, после чего с помощью интегразы вирусная ДНК «встраивается» в ДНК клеточного генома (провирус).

Патогенез

- Вирус становится частью клетки и будет оставаться ею вплоть до ее гибели. В организме формируется вирусная инфекция, развивающаяся в дальнейшем по типу медленной инфекции. Неконтролируемое размножение ВИЧ в различных органах, которое сочетается с интенсивным мутационным процессом вируса, приводит в конечном итоге к формированию агрессивных штаммов ВИЧ.

Патогенез

- Образование и превалирование агрессивных штаммов вируса вызывают быструю гибель CD-4 «+» клеток. Нарушение функции клеточного звена иммунитета, приводящее к нарушению бактерицидной киллерной и противоопухолевой активности, и в конечном итоге – развитию оппортунистических инфекций, аутоиммунных расстройств, злокачественных новообразований и поражению нервной системы.
- Все это обуславливает разнообразие клинической симптоматики и полиорганность поражений.

Клиническая классификация

- Цикл ВИЧ-инфекции в организме человека состоит из периодов проникновения, диссеминации возбудителя, первичного ответа организма, примерно равной борьбы его с возбудителем и постепенного ослабления защитных сил организма, сопровождающегося нарастанием проявлений оппортунистических инфекций.

Клиническая классификация

- Течение ВИЧ-инфекции имеет следующие этапы:
- Инфицирование вирусом.
- Первичная ВИЧ-инфекция.
- Сероконверсия.
- Латентный период:
 - а) с персистирующей генерализованной лимфаденопатией;

Клиническая классификация

- б) без персистирующей лимфаденопатии.
- Ранняя симптоматика ВИЧ-инфекции (СПИД-ассоциированный комплекс, пре-СПИД).
- СПИД.
- Прогрессирующая ВИЧ-инфекция, которая характеризуется уменьшением СД-4 «+» клеток до 50-ти в 1-м мкл крови.
- Наиболее удобной для использования является классификация ВОЗ, согласно которой выделяют 5 стадий заболевания.

Стадии ВИЧ

- **Стадия острого заболевания (острая инфекция).**
- Время от инфицирования до начала симптомов обычно составляет 2 – 4 недели. Типичными симптомами являются: лихорадка, аденопатия, фарингит, сыпь – эритематозная, макулопапулезная на лице, туловище, конечностях, язвенные повреждения полости рта, пищевода, гениталий, головная боль, тошнота, рвота, миалгии и артриты, диарея, гепатоспленомегалия, молочница.

Стадии ВИЧ

- Уменьшение числа CD-4+ и CD-8+ лимфоцитов отмечается в первые 7-9 дней. Снижение количества CD-4+ клеток может быть значительным. К концу 2-й недели абсолютное количество CD-8+ клеток возрастает и происходит инверсия соотношения CD-4+ и CD-8+ лимфоцитов.

Стадии ВИЧ

- Острая инфекция сопровождается высоким уровнем вирусной нагрузки. Количество вирусных копий достигает 1000000-100000000 в 1 мл плазмы. Чем выше уровень вирусной нагрузки, тем больше диссеминация вируса в ЦНС и лимфоидную ткань. С прогрессированием заболевания структура лимфоидной ткани изменяется и ВИЧ освобождается.

Стадии ВИЧ

- Продолжительность латентной стадии связана с сохранением уровня CD4 – T-клеток более 500 в 1 мкл (норма 1000 в 1 мкл). Прогностически неблагоприятными являются высокие показатели вирусной нагрузки и снижение уровня CD4+ клеток ниже 500 в 1 мкл крови; при таких показателях болезнь переходит в следующую стадию.

Стадии ВИЧ

- **Стадия асимптомной инфекции.**
- Характеризуется отсутствием каких-либо клинических проявлений и симптомов ВИЧ-инфекции. Отнесение лиц к этой группе осуществляют на основании данных эпидемиологического анамнеза и лабораторных исследований. Последние включают поиск антител к ВИЧ в сыворотке, общий анализ крови (лимфопения, тромбоцитопения), определение СД 4 «+» и СД 8 «+» и их соотношение.

Стадии ВИЧ

- **Стадия ПГЛ.**
- Характеризуется увеличением лимфатических узлов в 2-х разных группах (исключая паховые лимфоузлы) более 1 см в диаметре, которые сохраняются не менее 1-го месяца.

Стадии ВИЧ

- Для ВИЧ-инфекции характерна лабильность лимфаденопатии в динамике: увеличение и уменьшение разных групп лимфатических узлов. ПГЛ может наблюдаться и на последующих стадиях заболевания, однако на этой стадии она является единственным клиническим проявлением.

Стадии ВИЧ

- При прогрессировании заболевания у пациентов определяется снижение СД 4 «+» лимфоцитов, появляются клинические симптомы, и заболевание переходит в следующую стадию – СПИД-ассоциированный комплекс.

Стадии ВИЧ

- **СПИД-ассоциированный комплекс (преСПИД, САК).**
- Включает появление таких заболеваний: кандидозный стоматит, оральная лейкоплакия, периферическая нейропатия, цервикальная дисплазия, рецидивирующий герпес, герпес Zoster, идиопатическая тромбоцитопения, листериоз, воспалительные заболевания органов малого таза, кандидозный вульвовагинит.

Стадии ВИЧ

- Общие симптомы: конституциональное состояние: лихорадка более 1 месяца, потеря массы тела, диарея, общая слабость; анорексия, гепатоспленомегалия, множественные фолликулиты, паротит, контагиозный моллюск.

Стадии ВИЧ

- Лабораторные признаки: анемия, лейкопения, тромбоцитопения, повышение уровня иммуноглобулинов А и G, уменьшение СД 4 «+» лимфоцитов крови – менее 400 клеток в 1 мкл (норма – 1000 кл. в 1 мкл), снижение соотношения СД 4 «+» / СД 8 «+» - ниже 1 (норма 1,5 – 2,0).

Стадии ВИЧ

- При уровне СД 4 «+» лимфоцитов 400-200 в 1 мкл. могут наблюдаться бактериальные поражения, опоясывающий лишай, кандидоз слизистой оболочки полости рта, туберкулез легких, эпизоды криптоспоридиоза, саркома Капоши, интраэпителиальная неоплазия шейки матки, рак шейки матки, анемия, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, лимфоидный интерстициальный пневмонит.
-

Стадии ВИЧ

- Возможно появление оппортунистических инфекций. Этот уровень снижения иммунитета соответствует нарастанию истощения, развитию периферической невропатии, деменции, лимфомы мозга, кардиомиопатии, прогрессирующего полирадикулоневрита, иммунобластной лимфомы.

Стадии ВИЧ

- **Стадия – СПИД.**
- Среднее время от начала тяжелой иммуносупрессии до диагноза СПИД составляет 12-18 месяцев у людей, не получавших антиретровирусное лечение.
- По определению ВОЗ (1994г.), диагноз СПИДа устанавливается у пациентов, имеющих АТ к ВИЧ, с количеством СД 4 «+» лимфоцитов менее 200 в 1 мкл и наличием одного из СПИД-индикаторных заболеваний.

Стадии ВИЧ

- К СПИД-индикаторным заболеваниям относятся:
- кандидозы пищевода, трахеи, бронхов и легких
- криптококкоз внелегочный; криптоспоридиоз кишечника хронический
- ЦМВ инфекция (с поражением других органов, кроме печени, селезенки, лимфатических узлов)
- цитомегаловирусный ретинит
- простой герпес: хроническая язва (продолжительность более 1 мес.); или бронхиты, пневмонии или эзофолиты;
- гистоплазмоз диссеминированный или внелегочной;

Стадии ВИЧ

- рак шейки матки;
- изоспороз кишечника хронический;
- ВИЧ-ассоциированная деменция;
- саркома Капоши;
- пневмония рецидивная;
- лимфоидная интерстициальная пневмония;

Стадии ВИЧ

- пневмоцистная пневмония;
- сальмонеллезная септицемия (нетипичная);
- токсоплазмоз мозга;
- туберкулез легких и внелегочной;
- другие микобактериозы, диссеминированные или внелегочные;

Стадии ВИЧ

- прогрессирующая многоочаговая лейкодистрофия;
- лимфома иммунобластная;
- лимфома мозга первичная;
- синдром истощения, обусловленный действием ВИЧ (потеря массы тела более 10 %, хроническое недомогание, необъяснимая лихорадка более 30-ти дней, хроническая диарея).

Лабораторная диагностика

- Диагностика ВИЧ-инфекции основана на сопоставлении эпидемиологических, клинических и лабораторных данных. Диагностика ВИЧ-инфекции включает 2 этапа:
- Установление собственно факта инфицирования ВИЧ
- Установление стадии заболевания

Лабораторная диагностика

- Лабораторная диагностика ВИЧ-инфекции у человека может осуществляться следующими методами:
- выявление антител к вирусу или его отдельным антигеном (ИФА к ВИЧ);

Лабораторная диагностика

- выявление антигенов ВИЧ или его ДНК (ИБ и ПЦР);
- выделение культуры ВИЧ.
- Стадию заболевания, тактику лечения и прогноз можно определить по уровню CD 4 «+» Т-лимфоцитов, соотношению CD 4 «+» / CD 8 «+» и вирусной нагрузке (количество копий РНК ВИЧ в единице объема крови).

Серологические методы

- **Иммуноферментный анализ**
(критерий достаточной достоверности) ИФА является первым скрининговым этапом обследования. Он позволяет определить в сыворотке крови суммарные антитела к ВИЧ.

Серологические методы

- *Возможные ошибки.*
- 1. Появление ложноположительных результатов связано с тем, что целый ряд сывороточных белков обладает способностью интерферировать со специфическими антителами к ВИЧ.

Серологические методы

- У 90-95 % зараженных антитела к ВИЧ появляются в течение 3-х мес. после заражения, у 5-9 % - через 6 мес., т.е. в ранние сроки заболевания (период «окна») антитела к ВИЧ не определяются.

Серологические методы

- 3. На заключительной стадии заболевания, когда происходит значительное снижение уровня антител, они в крови могут не определяться

Серологические методы

- *Трактовка результата.* Если в ИФА получен положительный результат, проводят повторные исследования данного образца тем же методом с помощью другой тест-системы.

Серологические методы

- При 2-х отрицательных результатах повторных исследований кровь считается неинфицированной. Если же одно или оба исследования повторяют ранее полученный положительный результат, его перепроверяют на втором этапе – стадии экспертной диагностики.

Иммунный блот

- *(критерий значительной достоверности)*
- На этапе экспертной диагностики осуществляется исследование сыворотки крови с помощью метода ИБ, позволяющего установить наличие антител к индивидуальным протеинам ВИЧ.

Иммунный блот

- *Трактовка результата.* Выявление в сыворотке антител к поверхностным белкам ВИЧ в сочетании с антителами к ядерному белку, свидетельствует о наличии ВИЧ-инфекции. Положительной считается сыворотка при обнаружении антител к 2-м поверхностным белкам ВИЧ.

Иммунный блот

- Отрицательными считаются сыворотки, в которых не обнаруживаются антитела ни к одному из антигенов ВИЧ. Определение антител только к одному поверхностному белку в сочетании с другими структурными белками ВИЧ расценивается как сомнительный результат, и такой пациент нуждается в дальнейшем наблюдении.

Полимеразная цепная реакция

- (критерий большой достоверности)
- Этот метод позволяет определять генетический материал вируса даже в начальный период заболевания.
- *Недостатки метода*
- Проведение исследования ПЦР требует дорогостоящего оборудования, высокой квалификации персонала.

Выделение культуры вируса

- ***(критерий высокой достоверности)***
- Выделение вируса на практике связано с рядом проблем: дороговизна метода; низкое количество копий вируса в крови больных в некоторые периоды заболевания, что делает невозможным выделение вируса; длительность получения результата (2-4 недели).

- Стадию заболевания, тактику лечения и прогноз можно определить по уровню CD4+ Т-лимфоцитов, соотношению CD4+/CD8+ и вирусной нагрузке.

Определение вирусной нагрузки

- Под вирусной нагрузкой подразумевают количество РНК-копий в 1 мл крови, определенных ПЦР.

Определение вирусной нагрузки

- Показатель «вирусной нагрузки» используется для быстрой оценки эффективности антиретровирусной терапии. При эффективной антиретровирусной терапии уже к 4-8 неделе отмечается снижение уровня РНК-ВИЧ в 3-5 раз, к 12-16 неделе у большинства пациентов уровень РНК-ВИЧ становится неопределенным.

Определение вирусной нагрузки

- **Стадии**
 - АИ, ПГЛ
 - САК
 - преСПИД, СПИД
- **Количество копий**
 - 500-30000
 - 30000-100000
 - более 100000 копий в 1 мл

Создание вакцины

- Идея создания ВИЧ- вакцины возникла сразу и поначалу не сулила серьезных проблем ввиду того, что возбудитель известен, его антигены проанализированы вплоть до протективных эпитопов, гены клонированы и готовы к наработке любого количества высокоочищенного вирусного материала. Но до сих пор вакцина не создана по нескольким причинам.

Создание вакцины

- 1. Высокая антигенная изменчивость суперкапсидных гликопротеинов gp 120. Опыты нейтрализацией вируса в культурах клеток и на ВИЧ-инфицированных шимпанзе показывают, что протективный эффект против лабораторных штаммов не гарантирует защиты от клинических. Об этом говорят и единичные наблюдения о возможности заражения ВИЧ, несмотря на вакцинацию. Для этого нужны широкомасштабные мероприятия.

Создание вакцины

- 2. Проверка эффективности вакцин сопряжена с большими трудностями. Экспериментальные модели, дублирующие инфекцию человека (СПИД обезьян, кошек), приносят пользу, но имеют очевидные ограничения. Шимпанзе восприимчивы к ВИЧ, но клинически инфекция у них не проявляется. Исследования на клеточных культурах позволяют изучить базисные закономерности инфекции, но не соответствуют клинической реальности. Испытания на людях сопряжены с серьезными проблемами.

Создание вакцины

- 3. Не ясен вопрос о возможности унификации вакцин при разных способах инфицирования. Например, вакцины на основе оболочечных антигенов предупреждают развитие инфекции при внутривенном заражении (опыты на шимпанзе), но длительность эффекта и его надежность при мукозальной инвазии (половой путь) остаются неясными.

Создание вакцины

- Сейчас наметился отход от антител как единственного критерия иммуногенности вакцин. Появился интерес к Т-вакцинам, которые стимулируют клеточный иммунитет, реализуемый цитотоксическими Т-лимфоцитами. При ВИЧ-инфекции они появляются раньше вируснейтрализующих антител, сдерживая репликацию вируса. Есть данные, что цитотоксические Т-лимфоциты способны полностью уничтожить ВИЧ-содержащие , которые , несмотря на повторные контакты с ВИЧ, остались незараженными. У таких лиц серонегативность сочетается с наличием анти-ВИЧ CD8 Т-лимфоцитов.

Создание вакцины

- Кроме поверхностных гликопротеинов Т-активностью обладают внутренние белки вириона и даже регуляторные пептиды. Т-эпитопы более консервативны, чем структуры, возбуждающие синтез антител, а, значит, вакцины, полученные на их основе, будут более универсальны, т.е. менее зависимы от изменчивости вируса. Работать будет лучше вакцина из цельных вирионов – убитых или аттенуированных. Проверялось и то и другое, но с неоднозначным результатом. Причем страх перед вирионными вакцинами очень велик вследствие остаточной инфекционности.

Возможности использования вируса

- В настоящее время идут исследования по возможности использования вируса в генотерапии. Американские ученые из Калифорнии в 2005 году получили ВИЧ, который за счет отсутствия антигенов, вызывающих заболевание, безопасен для организма человека, но способен распознавать раковые клетки. Удалив оболочку вируса, они лишили его антигенов, позволяющих соединяться с клетками иммунной системы, имеющими CD-4.

Возможности использования вируса

- Поместив нуклеоид в оболочку другого вируса, за счет антигенов новой оболочки добились способности модифицированного вируса распознавать раковые клетки, на поверхности которых находится маркер Р- гликопротеин. Если в такой вариант вируса ввести ген, убивающий раковые клетки, то решается вопрос генотерапии рака.

Возможности использования вируса

- Следовательно, подобный сконструированный вариант ВИЧ выступает в качестве носителя нужного гена, отсутствие подобного носителя на сегодня тормозит внедрение генотерапии рака. Первые опыты с мышами, больными меланомой с метастазами в легкие, показали, что модифицированный ВИЧ с кровью поступал в легкие, где внедрялся в клетки опухоли.