

Интерпретация молекулярных методов диагностики социально-значимых инфекционных заболеваний

Шахгильдян В.И.

Старший научный сотрудник,

Врач-инфекционист высшей категории, к.м.н.

**ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-МЕТОДИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ПБ СПИД
ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора**

**Врач-инфекционист (консультант) Клинического госпиталя
«Лапино» и Перинатального Медицинского Центра**

ГК «Мать и дитя»

29.01.2018 г.

ЯРОСЛАВЛЬ

Возможные группы

- - с “**истинно-положительным**” (ИП) в отношении заболевания значением маркера, когда присутствует и лабораторный маркер, и заболевание;
- - с “**ложноположительным**” значением (ЛП), когда имеется лабораторный маркер, но заболевание отсутствует;
- - с “**истинно-отрицательным**” значением (ИО), когда отсутствуют и лабораторный маркер, и заболевание;
- - с “**ложноотрицательным**” значением (ЛО), когда нет в наличии лабораторного маркера, но заболевание имеется.

Диагностическая (клиническая) чувствительность и специфичность лабораторного теста

- Чувствительность диагностического теста – возможность выявить тех пациентов, кто имеет заболевание

Чувствительность - $100\% \times \text{ИП} / (\text{ИП} + \text{ЛО})$;

- Специфичность диагностического теста - возможность выявить тех пациентов, кто не имеет заболевание

Специфичность - $100\% \times \text{ИО} / (\text{ИО} + \text{ЛП})$.

Определение ДНК возбудителя в биологических жидкостях и тканях методом ПЦР

Преимущества:

- наиболее высокие аналитические чувствительность и специфичность**
- возможность исследовать биоматериал на наличие нескольких возбудителей одновременно**
- возможность определения количества возбудителя в биологическом материале**
- быстрое получение результата (от 3-5 часов)**
- возможность стандартизации методик**

Актуальность применение молекулярных методов исследования для диагностики инфекционных заболеваний обусловлена:

- низкой клинической чувствительностью (ТБ)**
- низкой клинической специфичностью стандартных диагностических методов (ЦМВИ, ТБ)**
- длительностью и трудоемкостью выполнением «золотых стандартов» (посевы, вирусологические методы)**
- необходимостью выявлять активность репликации возбудителя (количества копий ДНК (РНК) в биологическом материале) для постановки диагноза и обоснования этиотропной терапии**

I группа

- **Диагностическое значение выявления ДНК (РНК) возбудителя доказано. Диагностические (клинические) чувствительность и специфичность составляют около 100%.**
- **Обязательны к использованию в реальной клинической практике.**

Наличие в РНК (ДНК) возбудителя в биоматериале – подтверждение диагноза

РНК ВИЧ – ВИЧ-инфекция

ДНК HBV – гепатит В

РНК HCV - гепатит С

РНК HDV – гепатит D

ДНК МБТ (мокрота, БАЛЖ)- туберкулез

РНК Rubella virus – краснуха

Национальные рекомендации по диспансерному наблюдению и лечению больных ВИЧ-инфекцией (клинический протокол), 2017

В приоритетном порядке АРТ рекомендуется назначать:
(строгая рекомендация, высокий уровень доказательности):

- пациентам с количеством РНК ВИЧ $>100\,000$ копий/мл;

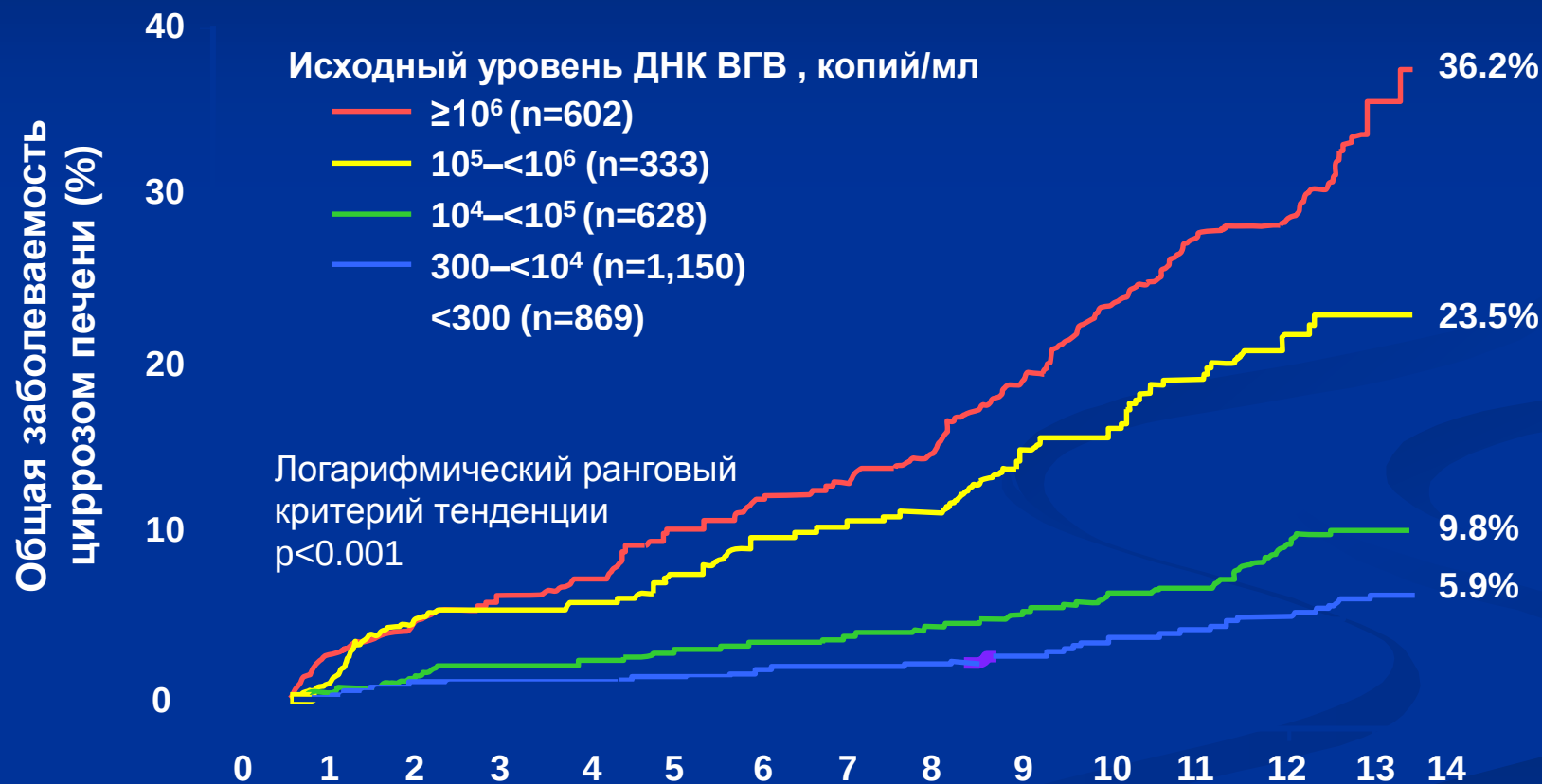
-

- **Неопределяемая «вирусная нагрузка»**
(РНК ВИЧ в крови <20 коп/мл):

- Эффективная АРВТ
- Нет риска вертикальной передачи ВИЧ
- Нет риска заражения ВИЧ половым путем, парентеральным путем

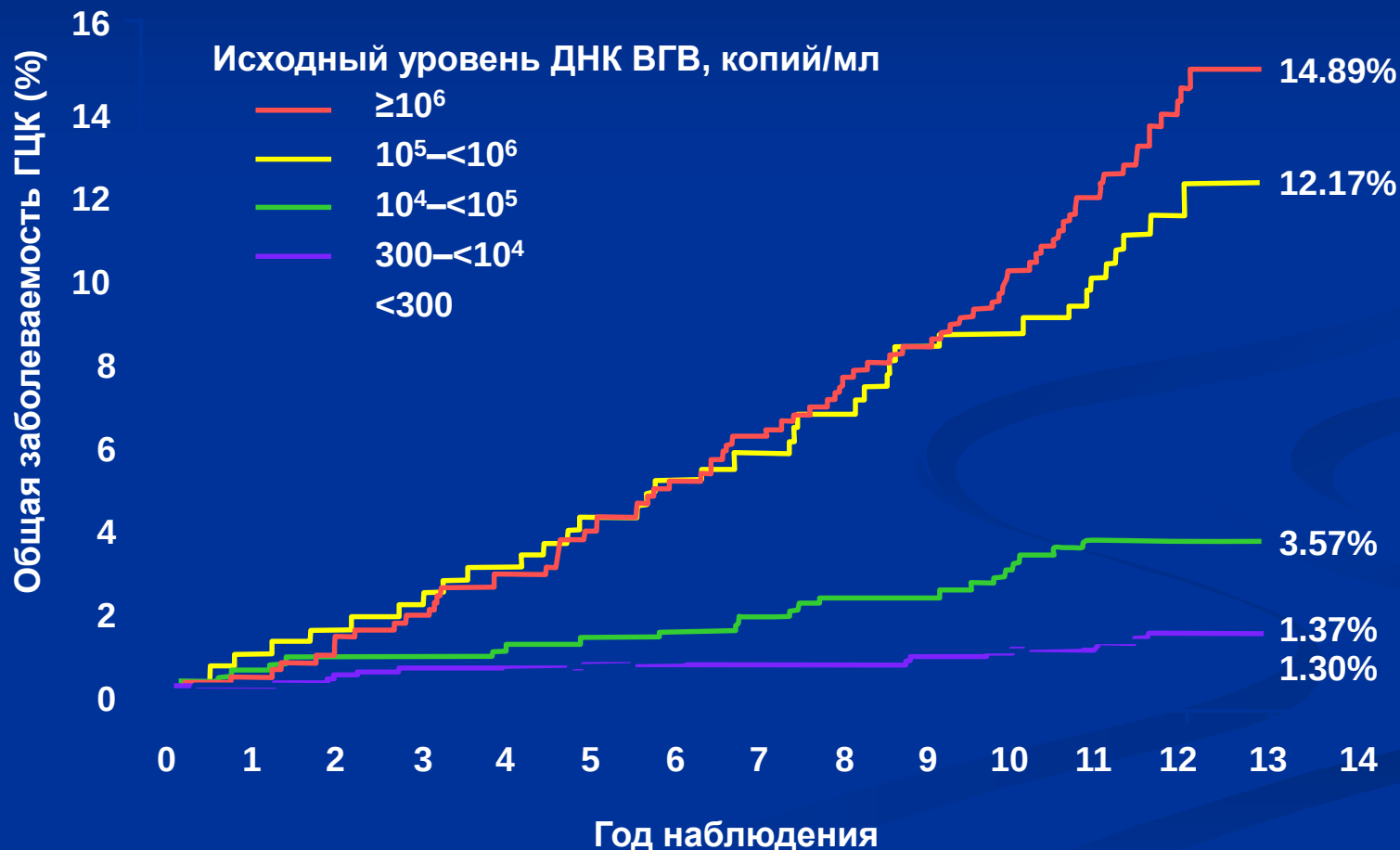
Концентрация ДНК ВГВ и риск цирроза

Общая заболеваемость циррозом печени
Всего случаев (n=3582)

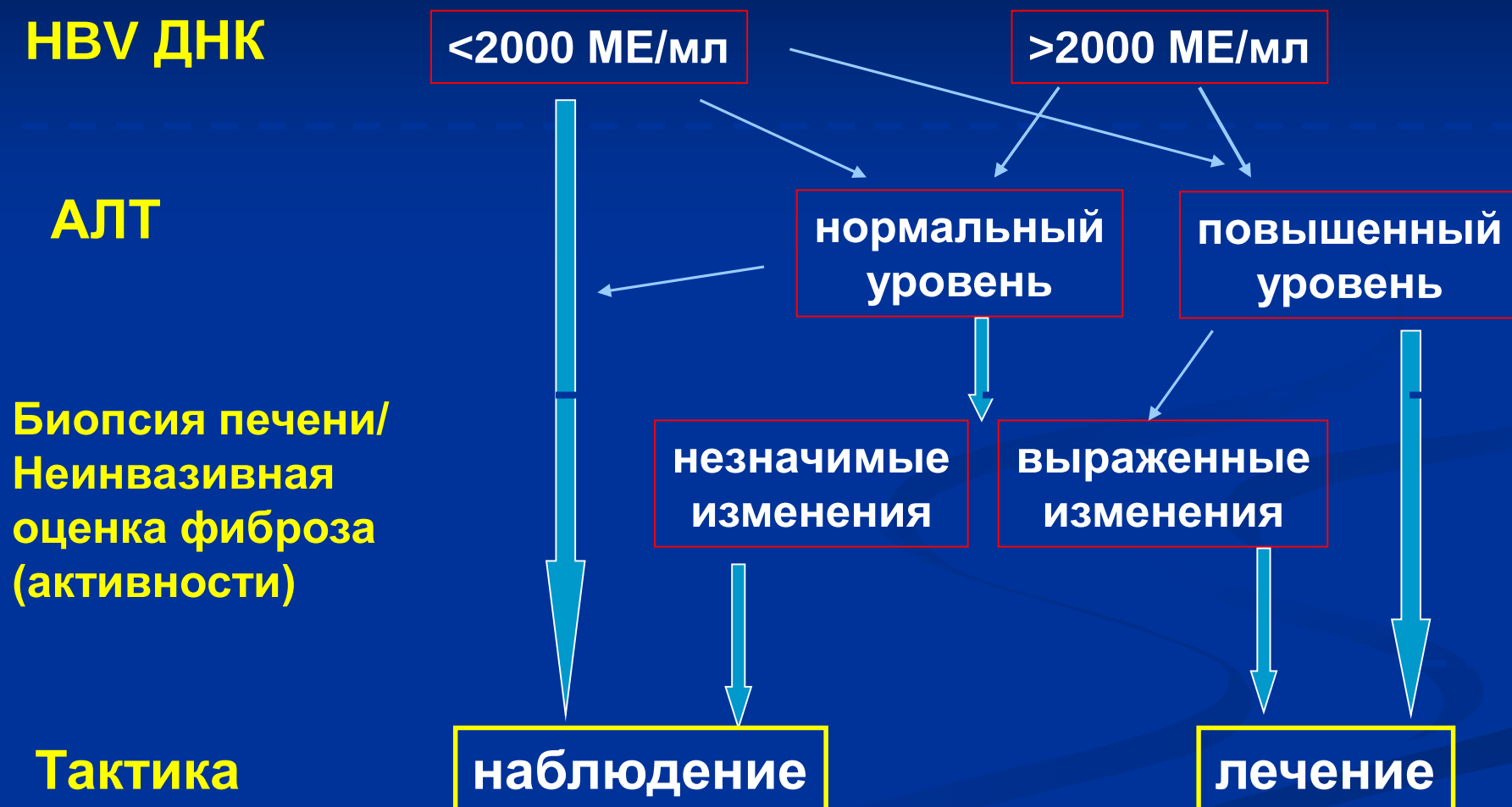


Концентрация ДНК ВГВ в крови и риск гепатоцеллюлярной карциномы

Общая заболеваемость ГЦК
Всего случаев (n=3653)



Алгоритм ведения пациентов с HBV-инфекцией



Цели терапии хронического гепатита В

- Предупреждение возникновения отдаленных клинических исходов (цирроз, ГЦК, летальный исход) при длительном подавлении ДНК HBV
- **Первичная конечная точка**
 - Устойчивое снижение уровня вирусной нагрузки до максимально низкого или неопределяемого
- **Вторичные конечные точки**
 - Снижение или нормализация уровня АЛТ
 - Улучшение гистологии печени
 - Элиминация HBeAg или сероконверсия
 - Элиминация HBsAg или сероконверсия

Принцип «дорожной карты» в лечении ХГВ



Профилактика врожденного гепатита В

- Назначение беременным тенофовира (виреада). Показания:

- Острый гепатит В,

- Наличие в крови ДНК HBV в высокой концентрации ($>10 \times 5$ МЕ/мл?), наличие HBeAg
(синдром отмены тенофовира)

- Введение специфического иммуноглобулина в 1-й день жизни ребенка;

- Вакцинация против гепатита В с первых часов жизни ребенка: 0 - 1 - 2 – 12 мес.



Диагностика гепатита С

(РФ: 3.5 - 4.7 млн. больных ХГС)

II ЭТАП

(окончательный)

- Обследование лиц с **anti-HCV IgG+** с целью установления диагноза ХГС:
наличие **РНК HCV (ПЦР)**
(качественный анализ)
- Диагноз гепатита С не может быть установлен только на основании наличия специфических антител!!!

Количественное определение РНК HCV

- Концентрация РНК HCV в крови – не является прогностическим маркером течения заболевания.
- Определение вирусной нагрузки необходимо только перед началом противовирусной терапии ХГС

Оптимальная продолжительность терапии ХГС

W4

W12

W24

W48

W72

РНК HCV
отр

G2/3

G1/4

24 недели
терапии *

48 недель
терапии

РНК HCV
отр

G2/3

G1/4

72 недели
терапии

РНК HCV
полож

> 2 log сниж
РНК HCV

РНК HCV
полож

Стоп

< 2 log сниж
РНК HCV

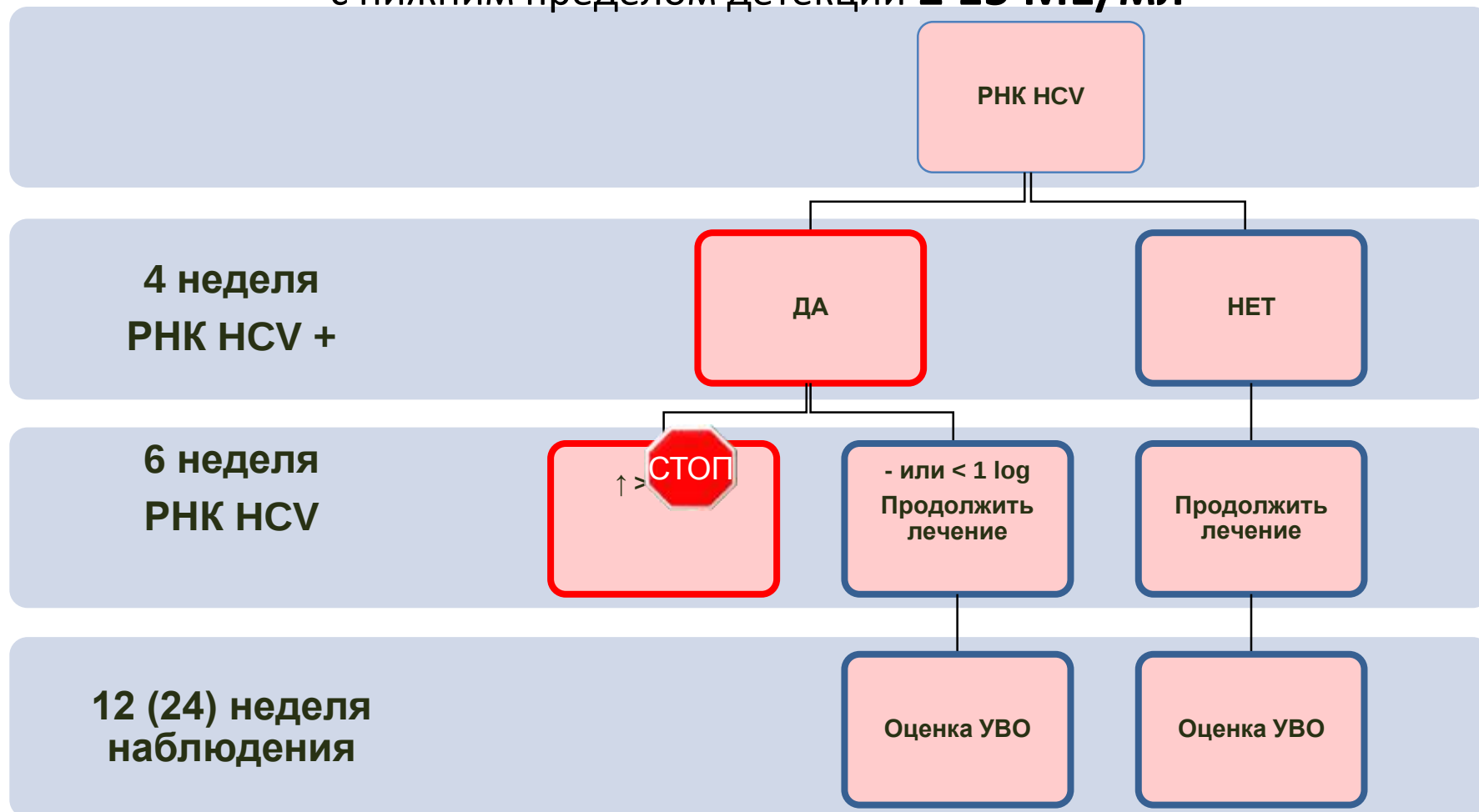
Стоп

* Для пациентов с исходно низкой вирусной нагрузкой ($<4 \times 10^5$ МЕ/л) и минимальным фиброзом печени

Soriano V, Puoti M, Sulkowski M, Cargnel, Benhamou Y, peters M, Mauss S, Brau N, Hatzakis A, Pol S, Rockstroh J. AIDS 2007 in press

Алгоритм мониторинга безинтерфероновой терапии ХГС (AASLD 2016)

Для оценки уровня РНК HCV в процессе и по окончании лечения необходимо использовать тесты на основе ПЦР в реальном времени с нижним пределом детекции ≤ 15 МЕ/мл



Результаты исследования БАЛЖ и биоптатов бронхов на наличие ДНК МБТ у больных ВИЧ-инфекцией

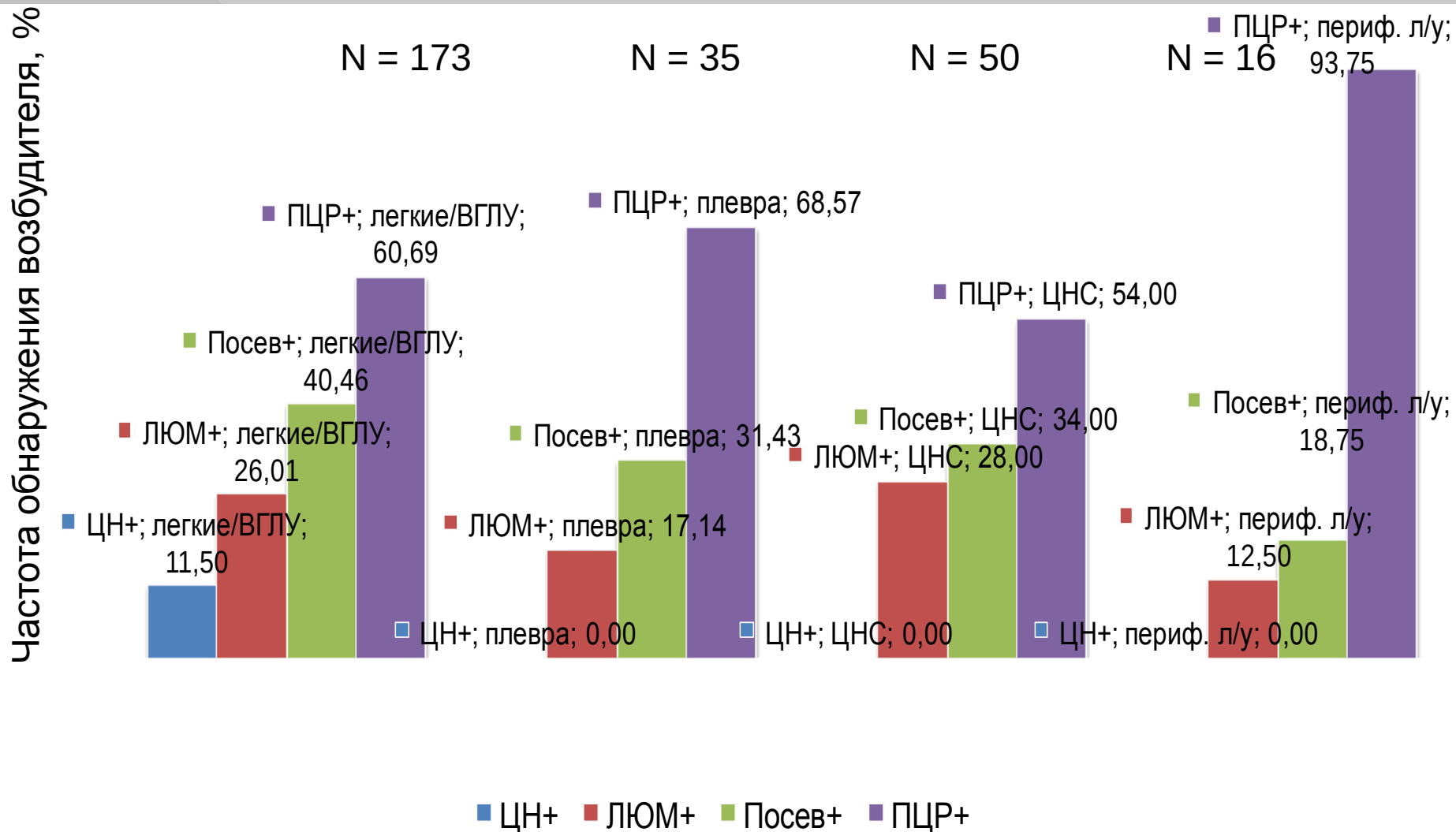
Шахгильдян В.И., Литвинова Н.Г., Морозова С.В., Шипулина О.Ю., 2006

- Диагностическая фибробронхоскопия – **744 больных** ВИЧ-инфекцией, ср.воз. 33.1 г., ст. СПИДа: 514 (69%) CD4-лимфоциты < 200 кл/мкл : 61%
- Больные туберкулезом легких: **255**
ДНК МБТ в лаважной жидкости: 182 (71%)
ДНК МБТ в биоптате бронхов: 156 (61%)
- **Диагностическая чувствительность наличия ДНК *M. tuberculosis* в БАЛЖ - 71%, специфичность – 88.5%.**
- **Диагностическая чувствительность наличия ДНК *M. tuberculosis* в биоптате бронха – 61.2%, специфичность – 98%.**

Абсолютное большинство (98%) ВИЧ-инфицированных пациентов, имевших ДНК МБТ как в БАЛЖ, так и в биоптатах бронхов, страдали туберкулезом легких. Туберкулез легких был диагностирован лишь у 14,1% больных, не имевших ДНК МБТ ни в БАЛЖ, ни в биоптатах бронхов.

Наличие ДНК МБТ в плевральной жидкости, ликворе, крови

Информативность различных методов при верификации ТБ в зависимости от локализации процесса (235 ТБ, 69 кон.гр.) (Альварес Фигероа М.В., Долгова Е.А., Шахгильдян В.И., 2014)



N - количество больных основной группы с указанной локализацией ТБ процесса

Выводы :

Применение метода ПЦР при диагностике ТБ у больных на поздних стадиях ВИЧ-инфекции

- выявляет МБТ со специфичностью 100% и частотой 44,8-93,8% (в зависимости от вида исследуемого материала и локализации ТБ процесса);
- увеличивает частоту верификации ТБ у больных на поздних стадиях ВИЧ-инфекции:
 - на 51,9% (95% ДИ: 44,0 - 58,8) по сравнению с бактериоскопией с окраской по Цилю-Нильсену;
 - на 39,2% (95% ДИ: 30,5 - 46,9) по сравнению с люминесцентной бактериоскопией;
 - на 30,2% (21,3 - 38,4) по сравнению с посевом
- снижает срок перевода больных в ТКБ до 1-5 дней;
- снижает сроки верификации диагноза в туберкулезном стационаре:
 - на 1-5 дня по сравнению с люминесцентной микроскопией;
 - на 22-75 дней по сравнению с посевом

Значение определения ДНК ВПГ-1,2 и ДНК ВВЗ в биологических материалах для диагностики герпесвирусных инфекций у взрослых больных

КИБ №2 г. Москвы: 68 ВИЧ-инфицированных больных (37 ВПГ и 31 ВВЗ)

Наличие ДНК ВПГ или ДНК ВВЗ в содержимом везикулы: 60 (88.2%)

Наличие ДНК ВПГ или ДНК ВВЗ в крови:

3 (4.4%) (1 б-й ВПГ и 2 б-х ВВЗ)

(Ф. Хашиева и др., 2004)

***Подтверждение диагноза ВО у беременных:
выявление ДНК ВВЗ в содержимом везикулы***

II группа

- Диагностическое значение качественного выявления ДНК (РНК) возбудителя доказано. Известны показатели диагностической чувствительности и диагностической специфичности.
- .
- Молекулярные методы рекомендованы для диагностики заболевания.
- Использование в реальной клинической практике не внедрено.

Значение наличия ДНК *Cryptococcus neoformans* в СМЖ для подтверждения диагноза криптококкового менингита (менингоэнцефалита)

- Диагностическая специфичность и чувствительность наличия ДНК *Cryptococcus neoformans* в СМЖ около 100%.

Значение наличия ДНК *JS-вируса* в СМЖ для подтверждения диагноза многоочаговой лейкоэнцефалопатии

- Диагностическая специфичность и чувствительность наличия **ДНК *JS-вируса*** в СМЖ 96-98%.

**Выявление ДНК ВГ-8 в элементах
саркомы Капоши – высокое значение для
подтверждения этиологии поражений**

- Реинфекция ЦМВ у матери обуславливает заражение плода значительно реже: 0,2–2,2% случаев, реактивация – до 20% случаев
- У 30-50% детей с врожденной ЦМВИ матери были серопозитивны (*Leung J, 2012 , Asher Ornoy, 2007*).

Значение различных маркеров активной ЦМВИ у беременных ВИЧ-инфицированных женщин для определения риска врожденного и внутриутробного заражения ребенка

**(ФНМЦ ПБ СПИД, ИКБ№2 г. Москвы,
ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора)**

Шахгильдян В.И. и др.

«Диагностика цитомегаловирусной инфекции у ВИЧ-инфицированных беременных женщин и определение факторов риска антенатального и перинатального заражения плода цитомегаловирусом»

«Акушерство и гинекология», 2005. – №2, с. 24 - 29

Значение лабораторных признаков активной репликации ЦМВ как факторов риска врожденной ЦМВИ

(Шахгильдян В.И. и др., 2007)

Маркеры активной ЦМВИ	Высок. титры IgG	Низко-авидные IgG	Ранн. IgG	IgM
Положительное прогностическое значение	16,7 %	33,3 %	13,3 %	50 %
Отрицательное прогностическое значение	84,4 %	92,2 %	84,4 %	92,2 %

Значение наличия ДНК ЦМВ в слюне, моче и крови ВИЧ-инфицированных беременных женщин как фактора риска врожденной ЦМВИ
(Шахгильдян В.И. , Сильц Н.В., Шипулина О.Ю. и др, 2007)

Прогностическое значение	ДНК ЦМВ		
	слюна	моча	кровь
Положительное	21,9 %	29,2 %	58,3 %
Отрицательное	95,9 %	96,2 %	96,6 %

Диагностика ЦМВИ у беременных

Наличие ДНК ЦМВ в клетках крови - высокоактивная ЦМВИ – высокий риск заражения плода – требуется назначение Неоцитотекта – обследование ребенка на ДНК ЦМВ в первые 2 и 4 недели жизни.

Наличие ДНК ЦМВ в моче – маркер умеренной активности вируса. Обуславливает дальнейший мониторинг беременной (повторение анализа на ДНК ЦМВ в крови) и обследование ребенка в первые 2 и 4 недели жизни.

Присутствие ДНК ЦМВ в слюне является маркером инфицированности, но НЕ свидетельствует о существенной вирусной активности.

(в зависимости от возраста, социального статуса вирус выделяется из слюны у 25 – 30% и мочи у 10 - 15% обследованных женщин, не имеющих клинических симптомов)

Диагностика ЦМВИ у новорожденного

- Достоверным методом подтверждения заражения ЦМВ новорожденного является выявление ДНК возбудителя.
- Материалами для исследования могут служить моча, кровь, мазок со слизистой ротовой полости, СМЖ и др.

Значение выявления ДНК ЦМВ в биоматериалах у новорожденных

- Выявление ДНК ЦМВ в любой биологической жидкости в первые 14 (21) дней жизни ребенка является подтверждением антенатального заражения ЦМВ (врожденной ЦМВИ)
- Выявление ДНК ЦМВ в любой биологической жидкости в первые 4 – 6 недель жизни ребенка при отсутствии ДНК ЦМВ в первые 14 дней жизни является подтверждением интранатального заражения ЦМВ.
- Выявление ДНК ЦМВ в любой биологической жидкости после 6 -12 недель жизни ребенка при отсутствии ДНК ЦМВ в предыдущих исследованиях является подтверждением постанатального заражения ЦМВ.

•

ГГ – угроза репродуктивному здоровью женщин

- 85-90% случаев неонатального герпеса - результат интранатального инфицирования плода, 5-8% - врожденные формы, остальные – постнатальные.
- У 70% матерей инфекция протекает бессимптомно (у 2/3 беременных первичный ГГ – бессимптомный).

Первичный ГГ за месяц до родов	Риск заражения ребенка
	50-70%

Рецидив ГГ за несколько дней до родов	2-5%
---------------------------------------	------

ГГ в анамнезе	0,1%
---------------	------

(отсутствие клинических проявлений ГГ во время беременности)

(70-80% случаев неонатального герпеса!!!)

Показания для проведения исследования соскоба из цервикального канала на наличие ДНК ВПГ-1,2 на 32-34 неделе беременности

Ретроспективное скрининговое исследование 6904 женщин: 14 (0.2%) при родах ВПГ в вагинальном секрете, 1 новорожденный был инфицирован (0.014).

Показания:

- первичный генитальный герпес в 1 и/или 2 триместре
- рецидивы ГГ в 1 и/или 2 триместре
- наличие рецидивизирующего ГГ в анамнезе (до беременности)
- наличие рецидивизирующего ГГ у полового партнера
- наличие поражений ур/ген тракта н/генеза (жалобы, видимые изменения).
- наличие анти-ВПГ -1,2 IgM при плановом обследовании во время беременности

При выявлении ДНК ВПГ-1,2 в ур/ген соскобе – назначение лечения в профилактических целях

- Исследование сыворотки новорожденных на антитела к ВПГ - низкая диагностическая ценность (присутствие анти-ВПГ IgG материнских , нередкое отсутствие анти-ВПГ IgM, ложноположительные результаты).
- Достоверным методом диагностики герпесвирусной инфекции у новорожденных является **определение ДНК ВПГ-1,2.**
Материалами для исследования могут служить жидкость везикул, кровь, моча, соскобы со слизистой ротовой полости, СМЖ.

Клиническое значение выявления ДНК *T. gondii* в СМЖ у больных ВИЧ-инфекцией с поражением ЦНС

Шахгильдян В.И., Шипулина О.Ю., 2004

КИБ №2 г. Москвы: 170 больных ВИЧ-инфекцией с поражением ЦНС:

Церебральный токсоплазмоз: 35

Наличие ДНК *T. gondii* в ликворе: 9

Специфичность: 100%

Чувствительность: 26%

Перегудова А.Б., Шахгильдян В.И., Шипулина О.Ю., 2007

КИБ №2 г. Москвы: 156 больных ВИЧ-инфекцией с поражением ЦНС:

Церебральный токсоплазмоз: 57

Наличие ДНК *T. gondii* в ликворе: 12

Специфичность: 100%

Чувствительность: 30%

Перегудова А.Б., Шахгильдян В.И., 2013)

КИБ №2 г. Москвы: 384 больных ВИЧ-инфекцией с поражением ЦНС:

Церебральный токсоплазмоз: 173

Наличие ДНК *T. gondii* в ликворе: 12

Специфичность: 100%

Чувствительность: 36%

Врожденный токсоплазмоз

- Достоверным подтверждением заражения плода токсоплазмами – **выявление ДНК *T. gondii* в амниотической жидкости.**
- Терапевтическая тактика у беременных с острым токсоплазмозом зависит от результатов исследования амниотической жидкости на ДНК токсоплазмы:
при отсутствии ДНК *Tox.gondii* – ровамицин,
при выявлении ДНК *Tox.gondii* – бисептол.

Диагностика РV В19 – инфекции у плода и новорожденного

- УЗИ мониторинг состояния плода для своевременной диагностики неиммунной водянки (каждые 2 нед в течение 8-12 нед после острой инфекции у матери)
- Фиксирование частоту движений плода
- **Исследование амниотической жидкости, крови плода (кордоцентез) на ДНК РV В19**
- **Исследование ткани плаценты, крови, мочи, слюны, аутоптатов на ДНК РV В19**

IgG, IgM у новорожденного мало информативно. Низкая чувствительность.

Присутствие IgG в крови ребенка больше года – показатель инфицированности.

III группа

- Выявление ДНК (РНК) возбудителя мало информативно для постановки диагноза. Диагностическая специфичность качественного определения ДНК патогена низка.
- Необходимо использование количественных показателей - концентрации ДНК (РНК) возбудителя в биологическом материале.
- Использование в реальной клинической практике затруднено в связи с неустановленным клиническим значением различных концентраций возбудителя в том или ином биологическом материале.

**Специфичность и чувствительность маркеров
активности цитомегаловируса при развитии
манифестной ЦМВ-инфекции у больных СПИДом**
(Шахгильдян В.И., Шипулина О.Ю. и др., 1999)

Маркеры активности ЦМВ	Чувствительность %	Специфичность %
ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови (качественный анализ)	100	60.5

**Специфичность и чувствительность маркеров
активности цитомегаловируса при развитии
манифестной ЦМВ-инфекции у больных СПИДом**
(Шахгильдян В.И., Шипулина О.Ю. и др., 1999)

Маркеры активности ЦМВ	Чувствительность %	Специфичность %
ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови (качественный анализ)	100	60.5
ДНК ЦМВ в лейкоцитах крови, титр 4+ (1:1000)	97.1	97.7

Исследование биологических материалов

на наличие ДНК ЦМВ у больных ВИЧ-инфекцией

- 2005 г. проведено 1073 исследований крови (с 01.04 2005 - Real-time PCR)
- 2005 – 2006 г. проведено 1698 исследований цельной крови («АмплиСенс® CMV-Скрин-Титр–FRT», ФГУН ЦНИИЭ).
ДНК ЦМВ выявлена в 293 (17%) образцах, среднее количество составило 2.1 log₁₀ ДНК ЦМВ в 10х5 лейкоцитах.
-
- «АмплиСенс® CMV-Скрин-Титр–FRT», ФГУН ЦНИИЭ
(чувствительность тест-системы 100 копий/мл, линейный диапазон измерения: 500-10⁶ копий ДНК ЦМВ/мл)
- В 129 образцах крови ДНК ЦМВ обнаружена в количестве
 - < 1 log₁₀ ДНК ЦМВ: 11 случаев (8.5%),
 - 1.0 – 1.9 log₁₀ ДНК ЦМВ: 53 (41.1%),
 - 2.0 – 2.9 log₁₀ ДНК ЦМВ: 34 (26.4%),
 - 3.0 – 3.9 log₁₀ ДНК ЦМВ: 23 (17.8%),
 - 4.0 – 4.9 log₁₀ ДНК ЦМВ: 7 (5.4%),
 - 5.0 и более log₁₀ ДНК ЦМВ: 1 (0.8%),

Клиническое значение различных концентраций ДНК ЦМВ в цельной крови для диагностики манифестной ЦМВИ у ВИЧ-инфицированных больных (1698 больных, 96 пациентов с ЦМВИ)

(Шахгильдян В.И., Шипулина О.Ю. и др., 2007)

Маркеры активности ЦМВ	Чувствительность %	Специфичность %
1.0 – 1.9 Ig ДНК ЦМВ	3	92,5
2,0 – 2.9 Ig ДНК ЦМВ	24	96,6
3.0 – 3.9 Ig ДНК ЦМВ	46,9	99,7
4.0 и более Ig ДНК ЦМВ	26	100
3.0 и более Ig ДНК ЦМВ в 10х5 лейкоцитов	72,9	99,7

Роль ПЦР в диагностике манифестной ЦМВ-инфекции у ВИЧ-инфицированных больных

(Шахгильдян В.И., Шипулина О.Ю. и др., 1999, 2003, 2004, 2005, 2007)

- **Наличие высокой концентрации ДНК ЦМВ в крови подтверждает диагноз манифестной ЦМВИ**
- **В лейкоцитах крови: $> 3 \log_{10}$ ДНК ЦМВ в 10×5 лейкоцитах (Real-time PCR)**
«АмплиСенс® CMV-Скрин-Титр–FRT», ФГУН ЦНИИЭ
(чувствительность тест-системы составляет 100 копий/мл, линейный диапазон измерения: 500- 10^6 копий ДНК ЦМВ/мл)

Исследование крови на наличие ДНК ЦМВ у больных ВИЧ-инфекцией

- Проведено **543** исследования плазмы крови («АмплиСенс® CMV-Монитор–FRT ФГУН ЦНИИЭ»).

ДНК ЦМВ выявлена в **201 (37%)** образцах, в количестве от 200 до 1 000 000 коп/мл.

- В плазме крови: > 10 000 копий ДНК ЦМВ в мл плазмы – коррелирует с ЦМВ-болезнью

Диагностическое значение обнаружения ДНК ЦМВ в БАЛЖ и биоптатах бронхов

(Шахгильдян В.И., Литвинова Н.Г., Шипулина О.Ю. и др., 2006)

Диагностическая фибробронхоскопия – **744** больных ВИЧ-инфекцией (CD4-лимфоциты < 200 кл/мкл – 75%).

- ДНК ЦМВ в БАЛЖ – **294 (39.5%)**, биоптатах бронхов – **112 (15.1%)**
- Больные ЦМВ-пневмонией: **70**
- Диагностическая чувствительность наличия ДНК ЦМВ в БАЛЖ - **90%**, специфичность – **66%**.
- Диагностическая чувствительность наличия ДНК ЦМВ в биоптате бронха - **79%**, специфичность – **92%**.

- **Цель:** определение диагностического значения выявления ДНК возбудителей вторичных заболеваний в различных биологических материалах у больных ВИЧ-инфекцией.

- **Методы и объем исследования.**

С 2007 – 2014 гг. проводились клиническое и лабораторное обследование 5 367 взрослых больных ВИЧ-инфекцией, в 63% случаев имеющих стадию 4Б-4В (СПИД) и проходящих стационарное лечение в ИКБ №2 ДЗ г. Москвы.

Средний возраст пациентов: $35 \pm 5,3$ лет.

Количество CD4-лимфоцитов в крови:

< 200 кл/мкл: 63% больных,

200 -350 кл/мкл: 15%,

350-500 кл/мкл: 12%,

>500 кл/мкл: 10%.

Шахгильдян В.И., Ядрихинская М.С., Шипулина О.Ю., 2016

Было исследовано:

4076 образцов цельной крови,

1445 образцов бронхоальвеолярного лаважа (БАЛЖ),

235 биоптатов бронхов,

65 образцов плевральной жидкости,

41 образцов мокроты,

87 биоптатов пищевода, желудка, толстой кишки,

83 биоптатов периф. лимфоузлов,

1602 образцов ликвора,

биоптат околоушной слюнной железы - **1**, биоптатов брюшины - **5**, биоптат миндаины - **1**, пунктат из «натечника» - **2**, соскоб из ротоглотки - **1**, выпот из брюшной полости - **2**, отделяемое из раны - **1**, стернальный пунктат - **1**, пунктат из пиогенной капсулы - **1**.

7 649 биоматериалов

Шахгильдян В.И., Ядрихинская М.С., Шипулина О.Ю., 2016

Полученные биологические материалы исследовали на качественное и количественное определение

- ДНК *M. tuberculosis*,
- ДНК Cytomegalovirus,
- ДНК *P. jiraveci* (*carinii*)
- ДНК *C. albicans*,
- ДНК *C. glab.*,
- ДНК *C. cruz.*,
- ДНК *C. neoform.*,
- ДНК *T. gondii*,
- ДНК *H. Simplex I-II*, HerpesVI, EBV,
- ДНК JC-virus
- РНК HIV

молекулярными методами с использованием ПЦР-тест-систем производства ФБУН ЦНИИ эпидемиологии

Клиническую чувствительность лабораторного признака определяли согласно формуле: $\text{ИП}/(\text{ИП} + \text{ЛО}) \times 100\%$; клиническую специфичность – по формуле: $\text{ИО}/(\text{ИО} + \text{ЛП}) \times 100\%$.

Шахгильдян В.И., Ядрыхинская М.С., Шипулина О.Ю., 2016

Биоматериал	ДНК ЭБВ (%)	ДНК ЦМВ (%)	ДНК ВПГ-1,2 (%)	ДНК ВП-6 (%)	ДНК ВВЗ (%)
Мокрота	89	85	29,5	10	
БАЛЖ	71	90		33	
Биоптат бронхов	54	21		5	
Плев. жидкость	58	36			
Биоптат л/у	71	16,4	3,6	7,2	
Биоптат ЖКТ	69,2	80,7	11,5	15,3	0
Ликвор	26,7	10,4	2,4	1,5	1,2
Кровь	71,4	плаз. 19,3 лейк. 51,7			

Количественное содержание ДНК ЦМВ в БАЛЖ

- Образцы БАЛЖ (873): ДНК ЦМВ 100 – 79 900 700 коп/мл.

61% <1000 коп/мл,

20%: 1000 - 10 000 коп/мл,

12%: 10 000 - 100 000 коп/мл,

7%: >100 000 коп/мл.

Количественное содержание ДНК ЦМВ в мокроте, плевральной жидкости, л/у, ЖКТ

- Биоптаты бронхов: ДНК ЦМВ 169 – 90 972 коп.
69,2%: 100 - 1000, 15,3%: >1000 коп.
- Образцы мокроты: ДНК ЦМВ: 100 – 1 314 600 коп/мл
64%: <1000 коп/мл, 18%: 1000 - 10 000 коп/мл,
9%: 10 000 - 100 000 коп/мл, 9%: >100 000 коп/мл
- Плевральная жидкость: ДНК ЦМВ 100 – 17 900 коп/мл
21%: 100-1000 коп/мл, 14%: 1000-10 000 коп/мл,
7%: >10 000 коп/мл.
- Биоптаты лимфоузлов: ДНК ЦМВ 264–120 046 коп
50%: 100 – 1000 коп, 25%: 1000 – 10 000 коп,
12,5%: 10 000 – до 100 000 коп., 12,5%: >100 000 коп.
- Биоптаты кишечника: ДНК ЦМВ 99 – 444 834 коп.
23%: <1000 коп., 7,7%: 1000-10 000 коп.,
23%: 10 000 – 100 000 коп. 11,5%: >100 000 коп.

Количественное содержание ДНК ЦМВ в СМЖ

- Обнаружение ДНК ЦМВ в ликворе не является достаточным основанием для постановки диагноза ЦМВ-энцефалита.
- Количество ДНК ЦМВ в СМЖ: 100 - 4 373 385 коп/мл.
 - < 1000 коп/мл - 64,9%,
 - 1000 - 10 000 коп/мл - 20,6%,
 - 10 000 - 100 000 коп/мл - 11,3%,
 - >100 000 коп/мл - 3,2%
- Вероятно, наличие ДНК ЦМВ в спинномозговой жидкости в концентрации > 10 000 коп/мл у больных энцефалитом указывает на ЦМВ-природу поражения головного мозга

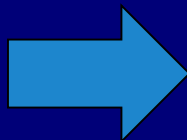
Диагностика острой ЦМВИ

Инвазивные методы диагностики:

- Амниоцентез: ПЦР амниотической жидкости 16-22 нед. беременности
- Кордоцентез : исследование пуповинной крови на наличие вируса и IgM

Доказательство заражения плода - обнаружение ДНК ЦМВ в амниотической жидкости и пуповинной крови.

При выявлении IgM,
низкоавидных IgG антител,
ДНК ЦМВ в крови или
ДНК ЦМВ в моче + IgM



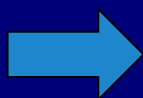
амниоцентез и исследование амниотической жидкости через 5–7 нед. после постановки диагноза острой ЦМВИ у матери, но не ранее 16 нед. и не позднее 22 нед. гестации.

Положительное прогностическое значение (вероятность выявления факта заражения плода) составляет 90-100%, отрицательная прогностическая ценность (специфичность) – 92-98%.

Диагностика острой ЦМВИ

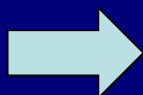
Доказательство заражения плода - обнаружение ДНК ЦМВ в амниотической жидкости и пуповинной крови.

При количестве ДНК ЦМВ <10х3 коп/мл



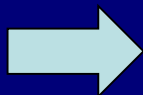
ребенок останется не инфицированным в 83% случаев

При количестве ДНК ЦМВ 10х3 коп/мл и более



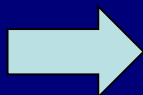
в 100% случаях ребенок заражен.

Уровень ДНК ЦМВ <10х5 коп/мл



с вероятностью 92% свидетельствует об отсутствии манифестации инфекции у плода и новорожденного.

Концентрация ДНК ЦМВ в амниотической жидкости 10х5 копий/мл и более



означает развитие у ребенка клинически выраженной ЦМВ-болезни.

При исследовании амниотической жидкости наличие ЦМВ в 2,5% у детей с врожденной ЦМВИ и 0% у здоровых (Petrikovsky et al., 2010)

Значение обнаружения ДНК ВПГ в крови и ликворе для диагностики неонатальной герпесвирусной инфекции (Н. Kimura, 2002)

37 детей с врожденной герпесвирусной инфекцией

12 - поражение кожи, слизистых, глаз, 13 - ЦНС, 12 – генерал. форма

Диагностика:

определение ДНК ВПГ в крови, ликворе в первые 3 дня жизни

Лечение:

ацикловир (30/45 мг/кг/сут 14-21 день) 37 детей

Исход:

26 – выздоровление, 6 – неврологические последствия, 5 - умерли

Результаты:

- **Наличие ДНК ВПГ в крови: поражение кожи, глаз – 27%**
патология ЦНС – 73%
генерализованная форма – 100%
- **Наличие ДНК ВПГ в ликворе: поражение кожи, глаз – 30%**
патология ЦНС – 100%
генерализованная форма – 86%
- **Всего: Наличие ДНК ВПГ в крови 68%, в ликворе 71%**

Значение концентрации ДНК ВПГ в крови для диагностики неонатальной герпесвирусной инфекции (*H.Kimura, 2002*)

Диагностическое значение концентрации ДНК ВПГ в крови:

поражение кожи, глаз – 10 коп/мл

патология ЦНС – 10^2 коп/мл

генерализованная форма – 10^6 коп/мл

Концентрация ДНК ВПГ в крови коррелировала с риском летального исхода: из 6 больных с концентрацией ДНК ВПГ 10^6 коп/мл – 4 (67%) умерли

Концентрация ДНК ВПГ в ликворе также коррелировала с риском летального исхода

Диагностика РV В19-инфекции у беременных

Сероконверсия анти-РV В19 IgG + IgM

Выявление в крови ДНК РV В19 в количестве
> 6 Ig коп/мл

Вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ)

- **Инфекционный мононуклеоз**
- **Волосатая лейкоплакия (98% больных имеют АТ к ВИЧ)**
(одно- или двустороннее поражение боковых сторон языка в виде белых складок или выступов. Боли отсутствуют)
- **Неходжкенские лимфомы (3%) (17 - 28%) больных на поздних стадиях ВИЧ инфекции)**

Назофаренгиальная карцинома

Лимфома Беркита (В-клеточная неходжкенская лимфома)

Антиген или ДНК ВЭБ: в 28 – 78% биоптатах ткани опухоли

- **Поражения ЦНС (редко)**
- **Поражение легких?, ЖКТ?**

Роль ВЭБ в развитии злокачественных новообразований

- Лимфома Беркитта,
- В-клеточная лимфома,
- Первичная лимфома головного мозга.
- Ходжкинская лимфома,
- Назофарингеальная карцинома,
- Экстранодальная Т/НК-клеточная назальная лимфома,
Ангиоиммунобластоидная Т-клеточная лимфома,
Лимфогранулематоз,
- Плазмобластная лимфома,
- Посттрансплантационное лимфопролиферативное отторжение,
Лимфоэпителиальноподобная карцинома желудка,
- Карцинома печени, слюнных желез, тимуса, дыхательных путей,
пищеварительного тракта.

Около 1% всех новообразований вызваны ВЭБ. Чаще у пациентов с иммуносупрессией. Антиген ВЭБ – в 28-78% биоптатах ткани опухоли

•

Количественное содержание ДНК ВЭБ в биоматериалах

- **Кровь:** 1,0 - 3,3 Ig ДНК ВЭБ в 10х5 лейкоцитах,
- **Мокрота:** 2400 – 49 380 000 коп/мл
50%: <10 000 коп/мл, 12,5%: 10 000 до 100 000 коп/мл,
37,5%: >100 000 коп/мл
- **БАЛЖ:** 100 – 2 638 5100 коп/мл
38%: 100 - 5000 коп/мл, 31%: 5000-50 000 коп/мл,
8,5%: 50 000-100 000 коп/мл, 22,5%: >100 000 коп/мл
- **Плевральная жидкость:** 400 – 1 484 500 коп/мл
14%: <1000 коп/мл, 21%: 1000 – 10 000 коп/мл,
3,5%: 10 000 - 100 000 коп/мл, 11,5%: >100 000 коп./мл
- **Биоптаты лимфоузлов:** 100 – 1 553 247 коп.
21%: <1000 коп, 38%: 1000- 10 000 коп,
38%: 10 000 – 100 000 коп, 7%: >100 000 коп.
- **СМЖ:** 100 – 1 636 500 коп/мл
83%: <1000 коп/м, 11%: 1000–10 000 коп/мл,
4%: 10 000-100 000 коп/мл, 2%, >100 000 коп/мл
- **Биоптаты ЖКТ:** 100 – 19 100 коп

Клиническое значение количественного определения высокоонкогенных генотипов вируса папилломы человека (Кувевда Д.А., Шипулина О.Ю., 2017 г.)

- ВПЧ-тест должен иметь возможность выявлять только клинически значимую концентрацию вируса или дифференцировать клинически значимую от незначимой концентрации, что существенно повышает специфичность исследования.
- **«Порог значимости»** - вирусная нагрузка, ниже которой ВПЧ не встречается в образцах тяжелой дисплазии и РШМ (клинически незначимое инфицирование) – **3 lg (1000 копий) ДНК ВПЧ на 100 тыс. клеток человека.**
- **«Порог прогрессии»** – вирусная нагрузка, которая ассоциирована с большой вероятностью наличия или прогрессии в РШМ - **5 lg (100 000 копий) ДНК ВПЧ на 100 тыс. клеток человека.**
- Введение порога клинической значимости повышают диагностическую специфичность >20% при сохранении высокой диагностической чувствительности

Диагностическое значение обнаружения ДНК *Pn. jirovecii* (*carinii*) в БАЛЖ и биоптатах бронхов (Сафонова А.П., Шипулина О.Ю., Шахгильдян В.И. и др., 2008)

Диагностическая фибробронхоскопия (протестировано 483 образца (290 БАЛЖ, 193 биоптатов бронхов)– 360 больных ВИЧ-инфекцией и 63 пробы БАЛ от больных ТБ.

- **ДНК РСР + (положительный результат) 42 (11,7%).**

Клинический диагноз: РСР (14 б-х, 34%), пневмония н/э (7 б-х, 17%), пневмония н/э + ТБ ВГЛУ (12 б-х, 29%), ЦМВ-пневмония (8 б-х, 20%; у 4 б-х в сочетании с РСР и ТБ ВГЛУ)

- **ДНК РСР - (отрицательный результат) 318 (88,3%)**

Клинический диагноз РСР – 0 случаев.

В 63 пробах БАЛЖ больных ТБ (РСР-) – ДНК РСР: 0 случаев.

- **Диагностическая чувствительность и специфичность наличия ДНК РСР в БАЛЖ и/или в биоптатах бронха?**

Возможность одновременного определения ДНК нескольких возбудителей в биологическом материале: дифференциальный диагноз

Поражения дыхательной системы (мазок из носоглотки, ротоглотки, мокрота, БАЛЖ): микоплазмы, хламидии, пневмоцисты каринии, возбудители коклюша и паракоклюша, грибы рода *Candida*, МБТ, стрептококки гр. В, ЦМВ, ВПГ-1,2 и др.

Грипп и ОРВИ (мазок из носоглотки, ротоглотки, мокрота, БАЛЖ): вирусы гриппа, парагриппа, РНК RS-вирус, метапневмовирус, коронавирус, риновирус, аденовирус, бокавирус, парвовирус и др.

Поражения ЦНС (СМЖ): ТОХ, герпесвирусы, ЦМВ, JC-вирус, грибы рода *Candida*, криптококки, МБТ, стрептококки гр. В и др.

Кишечные инфекции (кал): шигелла, сальмонелла, кампилобактер, аденовирус, ротавирус, энтеровирус, астровирус, норовирус, эшерихии (энтерогеоморрагические, энтероинвазивные, энтеропатогенные, энтеротоксигенные)

Возможность одновременного определения ДНК нескольких возбудителей в биологическом материале: дифференциальный диагноз

Инфекции мочеполовой системы (в т.ч. ИППП) (соскоб из уrogenитального тракта, отделяемое цервикального канала, влагалища, моча): нейссерия гонорея, гонококк, хламидия трахоматис, микоплазма гениталиум, трихомонада, уреоплазма, гарнерелла, грибы рода Candida и др.

Врожденные заболевания: TORCH, PV B19, листерии

Мононуклеозоподобный синдром (кровь)): ДНК ВЭБ, ЦМВ, ВГЧ-6 в клетках крови с определением количества

Лихорадка неясной этиологии (кровь и др.)

- **Исследование биопсийных материалов:** гистология + ПЦР
- **Посмертные исследования (аутопаты):** гистология + ПЦР

Критерий эффективности лечения больных ВИЧ-инфекцией, ХГС, ХГВ

- Неопределяемая «вирусная нагрузка»:
РНК ВИЧ в крови <20 коп/мл (НЕ 400 коп/мл!)

Быстрый вирусологический ответ (БВО) при терапии ХГС:

РНК HCV <15-25 МЕ/мл (НЕ 150 МЕ/мл)

Полный ответ на лечение ХГВ:

ДНК HBV <25-60 МЕ/мл (НЕ 300 МЕ/мл)

**КЛИНИЧЕСКИЙ ДИАГНОЗ
ИНФЕКЦИОННОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ
ТРЕБУЕТ ОБЯЗАТЕЛЬНОГО
ЛАБОРАТОРНОГО
ПОДТВЕРЖДЕНИЯ**

**Достоверная лабораторная
диагностика заболевания – путь к
эффективному лечению, к
спасению жизни больного и
сохранения ее качества**